# Enzymologie und Genetik der Oxidationsreaktionen in der Flavonoid-Biosynthese höherer Pflanzen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
GUDRUN STOTZ
aus Tübingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536509_0005

# Enzymologie und Genetik der Oxidationsreaktionen in der Flavonoid-Biosynthese höherer Pflanzen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
GUDRUN STOTZ
aus Tübingen

1983

| | |
|---|---|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 1. September 1983 |
| Dekan: | Professor Dr. K.-P. Hadeler |
| 1. Berichterstatter: | Professor Dr. W. Seyffert |
| 2. Berichterstatter: | Professor Dr. H.-U. Seitz |

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Genetic control of flavanone 3-hydroxylase activity and flavonoid 3′-hydroxylase activity in Antirrhinum majus (Snapdragon).
G. Forkmann and G. Stotz
Z. Naturforsch. 36c, 411-416 (1981)

Oxidation of flavanones to flavones with flower extracts of Antirrhinum majus (Snapdragon).
G. Stotz and G. Forkmann
Z. Naturforsch. 36c, 737-741 (1981)

Hydroxylation of the B-ring of flavonoids in the 3′- and 5′-position with enzyme extracts from flowers of Verbena hybrida.
G. Stotz and G. Forkmann
Z. Naturforsch. 37c, 19-23 (1982)

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | MATERIAL UND METHODEN | 9 |
| 1. | Pflanzenmaterial | 9 |
| 2. | Enzympräparationen | 11 |
| 2.1. | Präparation des Rohextrakts | 11 |
| 2.2. | Gelfiltration des Rohextrakts | 11 |
| 2.3. | Mikrosomenpräparation | 11 |
| 3. | Bestimmung der Enzymaktivitäten | 12 |
| 3.1. | Zimtsäure-4-Hydroxylase | 12 |
| 3.2. | Flavanon-Oxidase | 13 |
| 3.3. | Flavanon-3-Hydroxylase | 13 |
| 3.4. | Flavonoid-3′-Hydroxylase | 14 |
| 3.5. | Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase | 14 |
| 4. | Enzymatische Synthese radioaktiver Substrate | 14 |
| 4.1. | (4a,6,8-$^{14}$C) Naringenin | 14 |
| 4.2. | (4a,6,8-$^{14}$C) Eriodictyol | 15 |
| 4.3. | (4a,6,8-$^{14}$C) Dihydrokämpferol | 16 |
| 4.4. | (4a,6,8-$^{14}$C) Dihydroquercetin | 16 |
| 4.5. | (4a,6,8-$^{14}$C) Apigenin | 16 |
| 4.6. | (4a,6,8-$^{14}$C) Pentahydroxyflavanon | 17 |
| 5. | Chromatographie | 17 |
| 5.1. | Laufmittel | 17 |
| 5.2. | Rf-Werte | 17 |
| 6. | Nachweis der Vergleichssubstanzen | 19 |
| 7. | Charakterisierung der Reaktionsprodukte | 19 |
| 7.1. | Nachweis | 19 |
| 7.2. | Identifizierung | 19 |
| 7.3. | Quantitative Auswertung | 20 |

Seite

8. Proteinbestimmung 20

9. Bestimmung des pH-Optimums 20

10. Chemische Synthese der Zimtsäure-CoA-Ester 20

11. Isolierung von Flavanoiden 20

12. Chemikalien 21

13. Abkürzungen 22

III. ERGEBNISSE 23

Zimtsäure-4-Hydroxylase 23

A. Oxidations-Reaktionen am Heterozyklus 28

1. Flavanon-3-Hydroxylase 28
1.1. Ergänzende Untersuchungen zur Flavanon-3-Hydroxylase aus Matthiola incana 29
1.1.1. Pflanzenmaterial 29
1.1.2. Einfluß der Mercaptoäthanolkonzentration auf die Enzymaktivität 30
1.1.3. Enzymaktivität im Verlauf der Blütenentwicklung 31
1.2. Flavanon-3-Hydroxylase aus A. majus 32
1.2.1. Pflanzenmaterial 32
1.2.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms 33
1.2.3. Genetische Kontrolle 37
1.3. Flavanon-3-Hydroxylase aus Petunia hybrida 38
1.3.1. Pflanzenmaterial 38
1.3.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms 39
1.3.3. Genetische Kontrolle 40
1.4. Weitere Flavanon-3-Hydroxylase-Mutanten 41
1.4.1. Pflanzenmaterial 41
1.4.2. Nachweis und Charakterisierung der Flavanon-3-Hydroxylase in den anthocyanhaltigen Blüten 43
1.4.3. Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität in anthocyanhaltigen und anthocyanfreien Linien 45

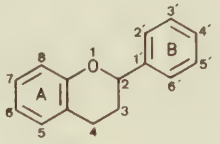
| | | Seite |
|---|---|---|
| 2. | Flavanon-Oxidase | 46 |
| 2.1. | Flavanon-Oxidase aus A. majus | 46 |
| 2.1.1. | Pflanzenmaterial | 46 |
| 2.1.2. | Nachweis und Charakterisierung des Enzyms | 46 |
| 2.2. | Flavanon-Oxidase in anderen Pflanzen | 51 |
| B. Oxidations-Reaktionen am B-Ring | | 52 |
| 1. | Flavonoid-3'-Hydroxylase | 52 |
| 1.1. | Ergänzende Untersuchung zur Flavonoid-3'-Hydroxylase aus Matthiola incana | 54 |
| 1.2. | Flavonoid-3'-Hydroxylase aus Antirrhinum majus | 54 |
| 1.2.1. | Pflanzenmaterial | 54 |
| 1.2.2. | Nachweis und Charakterisierung des Enzyms | 55 |
| 1.2.3. | Genetische Kontrolle | 56 |
| 1.3. | Flavonoid-3'-Hydroxylase aus Petunia hybrida | 58 |
| 1.3.1. | Pflanzenmaterial | 58 |
| 1.3.2. | Nachweis und Charakterisierung des Enzyms | 60 |
| 1.3.3. | Genetische Kontrolle | 65 |
| 1.4. | Flavonoid-3'-Hydroxylase aus Lathyrus odoratus | 66 |
| 1.4.1. | Pflanzenmaterial | 66 |
| 1.4.2. | Nachweis und Charakterisierung des Enzyms | 66 |
| 1.4.3. | 3'-Hydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit des Hydroxylierungsmusters der Flavonoide | 69 |
| 1.5. | Flavonoid-3'-Hydroxylase aus Callistephus chinensis | 69 |
| 1.5.1. | Pflanzenmaterial | 69 |
| 1.5.2. | Nachweis des Enzyms | 70 |
| 2. | Flavonoid-3',5'-Hydroxylase | 73 |
| 2.1. | Flavonoid-3',5'-Hydroxylase aus Verbena hybrida | 73 |
| 2.1.1. | Pflanzenmaterial | 73 |
| 2.1.2. | Nachweis und Charakterisierung des Enzyms | 74 |
| 2.1.3. | 3',5'-Hydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit des Hydroxylierungsmusters der Flavonoide | 77 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 2.2. | Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase aus Lathyrus odoratus | 79 |
| 2.2.1. | Pflanzenmaterial | 79 |
| 2.2.2. | Nachweis und Charakterisierung des Enzyms | 79 |
| 2.2.3. | Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit des Hydroxylierungsmusters der Flavonoide | 82 |
| 2.3. | Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase aus Callistephus chinensis | 82 |
| 2.3.1. | Pflanzenmaterial | 82 |
| 2.3.2. | Nachweis und Charakterisierung des Enzyms | 83 |
| 2.3.3. | Genetische Kontrolle | 84 |
| 2.4. | Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase aus Petunia hybrida | 85 |
| 2.4.1. | Pflanzenmaterial | 85 |
| 2.4.2. | Nachweis und Charakterisierung des Enzyms | 87 |
| 2.4.3. | Genetische Kontrolle | 89 |
| IV. | Diskussion | 90 |
| 1. | Zimtsäure-4-Hydroxylase | 92 |
| 2. | Flavanon-3-Hydroxylase | 94 |
| 3. | Flavanon-Oxidase | 99 |
| 4. | Flavanoid-3′-Hydroxylase | 103 |
| 5. | Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase | 114 |
| V. | Zusammenfassung | 123 |
| VI. | Literaturverzeichnis | 125 |

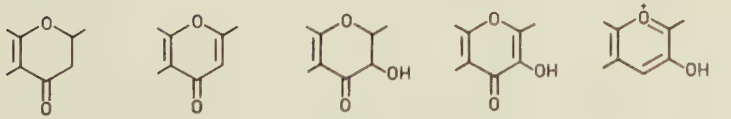
## I. EINLEITUNG

Flavonoide sind im Pflanzenreich weit verbreitete Pigmente, die insbesondere in Blüten aber auch in anderen Organen der Pflanzen wie Früchten, Blättern, Stengeln und Wurzeln akkumuliert werden. Ihre größte Bedeutung liegt sicherlich in der Anlockung von Insekten und Vögeln zur Bestäubung und zur Verbreitung der Samen. Aber sie spielen auch in der Absorption unerwünschter Strahlung, als Fraß- und Infektionsschutz und möglicherweise auch als Wachstumsregulatoren eine Rolle.

Die Flavonoide lassen sich vom $C_{15}$-Gerüst des Flavans (Abb. 1) ableiten und werden je nach Oxidationszustand des Heterozyklus in verschiedene Klassen gegliedert. Die wichtigsten Flavonoid-Klassen sind die Flavanone, Flavone, Dihydroflavonole, Flavonole und Anthocyanidine (Abb. 1). Modifikationen innerhalb einer Flavonoid-Klasse werden durch Hydroxylierung, Methylierung, Glykosidierung und Acylierung erreicht. Während die beiden letzteren Modifikationen überwiegend am Heterozyklus bzw. am A-Ring vorliegen, sind insbesondere die 3´und die 5´-Position des B-Rings bevorzugte Positionen der Hydroxylierung und Methylierung. Die Abb. 2 zeigt die unterschiedlich hydroxylierten Vertreter innerhalb der verschiedenen Klassen.




Flavan




Flavanon | Flavon | Dihydro-flavonol | Flavonol | Anthocyanidin

Abb. 1: Das Flavan-Grundgerüst und die wichtigsten Flavonoid-Klassen, gekennzeichnet durch den Oxidationszustand des Heterozyklus.

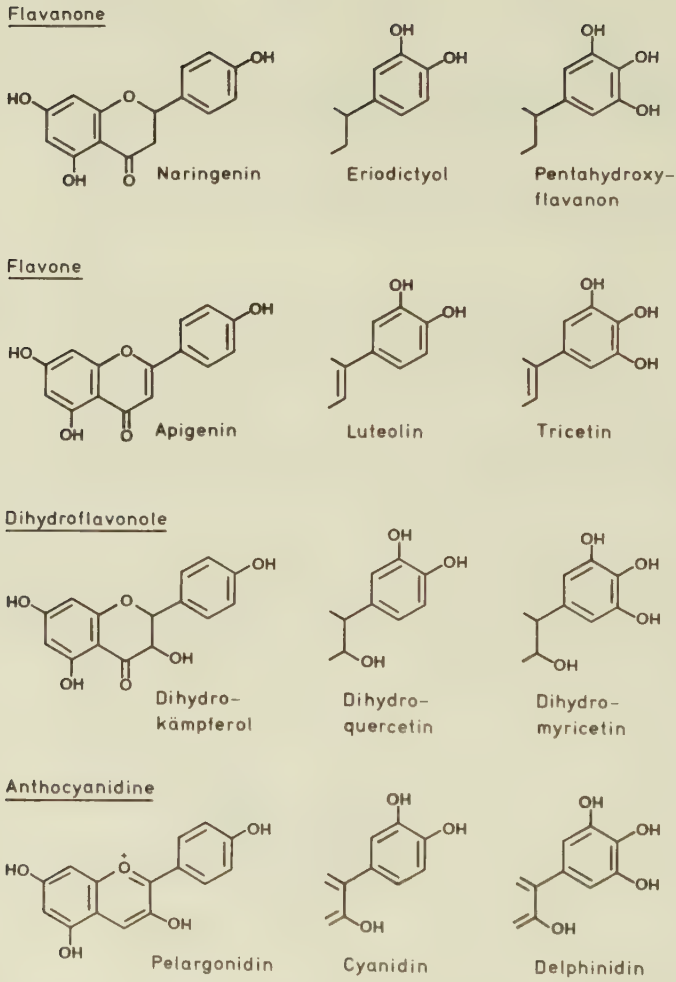



Abb. 2: Hydroxylierte Verbindungen innerhalb verschiedener Flavonoid-Klassen.

Zur Aufklärung der Flavonoid-Biosynthese sind zunächst ausgedehnte Untersuchungen mit Hilfe isotopenmarkierter Vorstufen durchgeführt worden. Sie gaben Aufschluß über die Bausteine der Flavonoide ebenso wie über den biogenetischen Zusammenhang einzelner Flavonoid-Klassen. Um jedoch genaue Kenntnisse über die Art, die Reihenfolge und die Regulation der einzelnen Biosyntheseschritte zu gewinnen, war es erforderlich, die hierfür verantwortlichen Enzyme nachzuweisen.

Die enzymatischen Untersuchungen begannen mit der Entdeckung der Phenylalanin-Ammonia-Lyase (PAL) aus Hordeum vulgare (Koukol und Conn, 1961). Weitere Fortschritte waren jedoch nur recht zögernd zu verzeichnen. So gelang erst einige Jahre später der Nachweis der nachfolgenden Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels. Die Zimtsäure-4-Hydroxylase wurde erstmals in apikalen Knospen von Erbsenkeimlingen (Russell und Conn, 1967) und die p-Cumarat-CoA-Ligase in Zellsuspensionskulturen von Petersilie (Hahlbrock und Grisebach, 1970) nachgewiesen.
Pflanzliche Zellkulturen erwiesen sich im weiteren Verlauf als günstige Enzymquellen, da sie die Möglichkeit bieten, durch Induktion bestimmte Stoffwechselwege zu stimulieren.

Mit ihrer Hilfe gelang schließlich auch der Nachweis von Enzymen der eigentlichen Flavonoid-Biosynthese, wie der Chalkonsynthase, Chalkon-Isomerase, verschiedener Glycosyltransferasen und einer Methyltransferase.

Die Chalkonsynthase, das Schlüsselenzym der Flavonoid-Biosynthese, katalysiert die Bildung des Flavonoid-Moleküls aus einer aktivierten Zimtsäure (Ring B) und drei Molekülen Malonyl-CoA (Ring A) (Kreuzaler und Hahlbrock, 1972).
Die Chalkon-Flavanon-Isomerase ist für die Gleichgewichtseinstellung zwischen Chalkon und Flavanon verantwortlich (Moustafa und Wong, 1967).
Während zunächst das Flavanon als erstes Reaktionsprodukt der Synthase angenommen wurde (Kreuzaler und Hahlbrock, 1975), und infolgedessen die Rolle der Chalkon-Isomerase in der Öffnung des Pyronrings zum Chalkon gesehen wurde, konnte durch chemogenetische und enzymatische Untersuchungen an Chalkon-akkumulierenden

Mutanten von Callistephus chinensis, Petunia hybrida und Dianthus caryophyllus zweifelsfrei bewiesen werden, daß das Chalkon das erste Reaktionsprodukt darstellt, welches dann von der Chalkon-Isomerase in stereospezifischer Weise in das entsprechende Flavanon überführt wird (Kuhn et al., 1978; Forkmann und Kuhn, 1979; Forkmann und Dangelmayr, 1980; Spribille und Forkmann, 1982b). Nachfolgende in vitro Untersuchungen mit hochgereinigter Chalkonsynthase aus Zellkulturen von Petersilie, Tulpenantheren und Blüten von Cosmos sulphureus bestätigten dieses Resultat (Heller und Hahlbrock, 1980; Sütfeld und Wiermann, 1981).

Neben der Chalkonsynthase und Chalkonisomerase waren auch bereits eine Methyltransferase und verschiedene Glykosyltransferasen bekannt. So gelang an belichteten Suspensionskulturen von Petersilie der Nachweis einer Flavonoid-spezifischen Methyltransferase, welche die Übertragung der Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf 3',4'-Dihydroxyflavonoide in meta-Position katalysiert (Ebel et al., 1972). Über Glykosyltransferasen lag bereits eine Fülle von Daten aus verschiedenen Pflanzen vor. Sie weisen sowohl positionsspezifische (3-O, 5-O, 7-O) als auch substratspezifische (Flavon, Flavonol, Anthocyanidin) Unterschiede auf.

Trotz dieser Fortschritte in der Enzymologie der eigentlichen Flavonoid-Biosynthese waren die vom Flavanon ausgehenden Reaktionen noch weitgehend unverstanden. Dazu gehören insbesondere Hydroxylierungs- bzw. Oxidationsreaktionen, die sowohl bei der Bildung verschiedener Flavonoid-Klassen (Abb. 1) als auch bei deren Modifikation (Abb. 2) von großer Bedeutung sind.

Isotopenmarkierte Vorstufen-Versuche an jungen Petersilie - Pflanzen hatten darauf hingedeutet, daß die Flavone durch Dehydrierung von Flavanonen und nicht durch Dehydratisierung von Dihydroflavonolen gebildet werden (Grisebach und Bilhuber, 1967). Einige Jahre später konnte dann auf enzymatischer Ebene gezeigt werden, daß zellfreie Extrakte aus jungen Primärblättern von Petersilie die Oxidation von Naringenin zu Apigenin katalysieren (Sutter et al., 1975). Es handelte sich um ein lösliches Enzym, dessen Aktivität von $O_2$, $Fe^{2+}$ und einem damals noch nicht identifizierten, hitzestabilen Kofaktor abhängig war.

Erste Anhaltspunkte für eine Hydroxylierung der 3′-Position des B-Rings der Flavonoide gaben enzymatische Untersuchungen an Blättern von Beta vulgaris (Vaughan et al., 1969; Roberts und Vaughan, 1971). Eine Phenolase-Aktivität katalysierte nicht nur die Hydroxylierung von p-Cumarsäure zu Kaffeesäure, sondern auch von Naringenin, Dihydrokämpferol und Kämpferol zu den entsprechenden 3′,4′-hydroxylierten Flavonoiden. Aufgrund der geringen Substratspezifität erschien es allerdings fraglich, ob diese Enzymaktivität in der Biosynthese der Flavonoide eine Rolle spielt. Ferner lagen die für eine Interpretation wichtigen Daten über die Art und die Konzentration der in den Spinatblättern vorhandenen Flavonoide nicht vor.
Eine höhere Substratspezifität besaß hingegen eine in der Mikrosomenfraktion lokalisierte Enzymaktivität aus Haplopappus-Zellkulturen (Fritsch und Grisebach, 1975). Sie katalysierte in Gegenwart von NADPH und $O_2$ nur die 3′-Hydroxylierung von Naringenin und Dihydrokämpferol, nicht aber die o-Hydroxylierung von p-Cumarsäure zu Kaffeesäure. Aber auch hier blieb die Frage offen, ob diese Enzymaktivität tatsächlich in vivo für die 3′-Hydroxylierung verantwortlich ist.

Eine andere Möglichkeit der 3′-Hydroxylierung des B-Rings zeigten enzymatische Untersuchungen an Blüten genetisch definierter Linien der Gattung Silene dioica auf (Kamsteeg et al., 1980). Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen wurde hier die ortho-Hydroxylierung nicht auf Zimtsäure- oder Flavonoid-Ebene, sondern auf der Ebene von p-Cumaroyl-CoA beobachtet. Außerdem konnte eine genetische Kontrolle dieser Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Somit lagen nur wenige und ferner recht unterschiedliche Ergebnisse zur Frage vor, wann und wie die 3′-Hydroxylierung des B-Rings der Flavonoide erfolgt. Außerdem gab es noch keine Hinweise zur Enzymatik der 3′,5′-Hydroxylierung.

Der Nachweis spezifischer 3′- bzw. 3′,5′-Hydroxylasen ist insbesondere für die Diskussion um den Zeitpunkt der Substitution des B-Rings der Flavonoide von großer Bedeutung. Hierzu liegen zwei Hypothesen vor, die "Zimtsäurestarthypothese" und die

"Substitutionshypothese", die sich jedoch beide fast ausschließlich auf Precursor- und Supplementationsexperimente stützen.
Die von Hess (1968) formulierte "Zimtsäurestarthypothese" nimmt an, daß das Substitutionsmuster des B-Rings bereits durch die genkontrollierte Auswahl einer entsprechend substituierten Zimtsäure bei der Synthese des Flavonoid-Grundgerüsts festgelegt wird. Hingegen wird nach der "Substitutionshypothese" das Substitutionsmuster des B-Rings erst zu einem späteren Zeitpunkt auf Flavonoid-Ebene determiniert. Die "Zimtsäurestarthypothese" bedeutet auf enzymatischer Ebene, daß die Chalkonsynthase eine hohe Substratspezifität besitzen muß, während die "Substitutionshypothese" spezifische, den B-Ring der Flavonoide substituierende Enzyme voraussetzt.

Zur enzymatischen Synthese der Dihydroflavonole gab es nur wenige Anhaltspunkte.
Die Mikrosomenfraktion von Haplopappus-Zellkulturen katalysierte nicht nur die Umwandlung von Naringenin zu Eriodictyol, sondern auch zu Dihydrokämpferol (Fritsch und Grisebach, 1975). Da jedoch die geringere 3 -Hydroxylierungsaktivität nicht von der dominierenden 3′-Hydroxylase-Aktivität abgetrennt werden konnte, blieb unklar, ob die 3′- und die 3 - Hydroxylierung von verschiedenen Enzymen katalysiert wird.

Diese Frage konnte jedoch eindeutig beantwortet werden, als es Forkmann et al. (1980) gelang, die Hydroxylierung in 3′- und 3- Position mit Proteinextrakten aus definierten Genotypen von Matthiola incana separat nachzuweisen. Die 3 -Hydroxylierung von den Flavanonen zu den Dihydroflavonolen katalysierte ein lösliches Enzym, das aufgrund seiner Kofaktoren zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Abbott und Udenfriend, 1974) gehört.
Eine genetische Kontrolle dieser Enzymaktivität konnte nicht aufgezeigt werden, da das entsprechende Gen bei Matthiola incana nicht bekannt ist.
Für die 3′-Hydroxylierung des B-Rings wurde dagegen ein Enzym nachgewiesen, das in der Mikrosomenfraktion lokalisiert und von NADPH abhängig war. Diese Eigenschaften klassifizieren es als mischfunktionelle Oxygenase oder Monooxygenase (Ullrich und Duppel, 1975). In Übereinstimmung mit chemogenetischen Befunden

(Seyffert, 1960; Forkmann, 1980) war der Nachweis der Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität ausschließlich auf Genotypen mit Wildtypallelen an dem für die Hydroxylierung der 3′-Position verantwortlichen Locus b beschränkt. Diese Korrelation zwischen Gen und Enzymaktivität erbrachte den Beweis, daß die Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität auch in vivo die Hydroxylierung der 3′-Position katalysiert.

Wie dieses Beispiel zeigt, sind genetische bzw. chemogenetische Befunde für die Interpretation von enzymatischen Ergebnissen von großer Bedeutung.
Die Flavonoid-Biosynthese bietet sich für enzymologische Untersuchungen in Verbindung mit chemogenetischen Befunden besonders an, da Gene für fast alle Syntheseschritte bekannt sind. Besonders zahlreiche Ergebnisse liegen zur Genetik der Variation innerhalb der Flavonoid-Klassen vor (Harborne, 1967). So gibt es auch für die Hydroxylierung des B-Rings in 3′- und in 5′-Position ein umfangreiches, genetisch definiertes Pflanzenmaterial. Genetische Daten zur Synthese der verschiedenen Flavonoid-Klassen sind hingegen weniger zahlreich doch von großer Bedeutung, da sie Aufschluß über den Ablauf der Flavonoid-Biosynthese geben können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Enzymologie der in der Flavonoid-Biosynthese wichtigen Hydroxylierungs- bzw. Oxidationsreaktionen an einem möglichst breiten Spektrum genetisch definierten Pflanzenmaterials aufzuklären. Als Ausgangspunkt für die enzymatischen Untersuchungen zur 3- und 3′-Hydroxylierung dienten die bereits vorliegenden enzymatischen Ergebnisse bei Levkojen.
Ferner sollte versucht werden, Einblick in die bislang weitgehend unverstandenen Probleme der Hydroxylierung des B-Rings in 5′-Position und der Flavonsynthese zu gewinnen.

Durch die Kombination chemogenetischer und enzymatischer Daten sollte es möglich sein,

a) die genetische Kontrolle der hydroxylierenden Enzyme nachzuweisen,
b) schlüssige Aussagen über den Ablauf der Flavonoid-Biosynthese zu gewinnen und
c) den Zeitpunkt der Hydroxylierung des B-Rings zu bestimmen.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Pflanzenmaterial

In die Untersuchungen wurde eine Reihe von Pflanzengattungen einbezogen, die teilweise genetisch definiert waren und teilweise aus dem Handelssortiment stammten.

Aufgrund jahrelanger Züchtung an unserem Institut lagen definierte Genotypen von Matthiola incana, Callistephus chinensis und Antirrhinum majus vor. Genetisch definierte Linien von Petunia hybrida sind uns vom Genetischen Institut der Universität Amsterdam überlassen worden.

Aus dem Handelssortiment wurden aufgrund der in der Literatur beschriebenen chemischen und chemogenetischen Untersuchungen folgende Pflanzengattungen ausgewählt und an unserem Institut weiterkultiviert:
Verbena hybrida, Lathyrus odoratus, Streptocarpus hybridus und Dahlia variabilis.

Das Pflanzenmaterial wurde aus Samen oder Stecklingen im Gewächshaus angezogen.
Petunia hybrida und Streptocarpus hybridus wurden im Gewächshaus weiterkultiviert, während der Anbau aller anderen Pflanzen in den Sommermonaten auf dem Versuchsfeld des Instituts erfolgte. Ein kleiner Teil dieses Materials wurde für Kreuzungsexperimente ebenfalls im Gewächshaus belassen.

Bei einigen der aufgeführten Pflanzengattungen sind Gene für Hydroxylierungsschritte in der Anthocyan-Biosynthese bekannt.
Sie sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tab. I: Gene für Hydroxylierungs-Reaktionen in verschiedenen Pflanzengattungen.

| Pflanzengattungen | Gene für | | |
|---|---|---|---|
| | Flavanon-3-Hydroxylierung | Flavonoid-3′-Hydroxylierung | Flavonoid-3′,5′-Hydroxylierung |
| Matthiola incana | - | $b^+$ | - |
| Callistephus chinensis | - | r′ | R |
| Antirrhinum majus | Inc | Eos | - |
| Petunia hybrida | An3 | Ht | Hf |
| Verbena hybrida | - | - | P |
| Lathyrus odoratus | - | Sm | E |

Die genaue Beschreibung dieser Hydroxylierungsgene und weiterer an der Anthocyanbiosynthese beteiligter Gene findet sich im Ergebnisteil.

## 2. Enzympräparationen

### 2.1. Präparation des Rohextrakts

Die Petalen wurden mit PVP bzw. Dowex 1x2, Quarz und Puffer in einem vorgekühlten Mörser in den folgenden Mengenverhältnissen homogenisiert:

1.0 g Petalen
0.5 g Quarz
0.5 g PVP (trocken) oder Dowex 1x2 (mit dem Extraktionspuffer äquilibriert)
2-4 ml Puffer (0.1 M K-Pi pH 7.5 oder 0.1 M Tris/HCl pH 7.5) mit 28 mM 2-Mercaptoäthanol.
Bei der Rohextraktpräparation für Flavanon-3-Hydroxylase-Tests enthielt der Tris/HCl-Puffer zusätzlich 10 mM Ascorbinsäure.

Das Homogenat wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, 10 min bei 10 000 xg zentrifugiert, der Überstand abgehoben und anschließend unter den gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert. Der klare Überstand der zweiten Zentrifugation diente als Enzymquelle.

### 2.2. Gelfiltration des Rohextrakts

Als Säulen für die Gelfiltration über Sephadex G-50 fine dienten Pasteurpipetten mit einem Bettvolumen von 1 ml. Diese Säulen konnten mit maximal 450 µl Rohextrakt beladen werden. Die Proteinlösung wurde mit dem Extraktionspuffer eluiert und so von niedermolekularen Substanzen gereinigt.

### 2.3. Mikrosomenpräparation

Zur Herstellung des Rohextrakts wurden folgende Mengen benötigt:
a. Nachweis der Zimtsäure-4-Hydroxylase
5 g Petalen
2.5 g Quarz
10 ml 0.1 M K-Pi pH 7.5 mit 2.8 mM 2-Mercaptoäthanol

b. Nachweis aller übrigen Enzyme

5.0 g Petalen
2.5 g Quarz
2.5 g Dowex 1x2 (mit 0.1 M K-Pi pH 7.5 äquilibriert)
10-15 ml 0.1 M K-Pi pH 7.5 mit 28 mM 2-Mercaptoäthanol.

Alle Arbeiten erfolgten bei $4^{o}C$.
Die Petalen wurden in einem vorgekühlten Mörser mit Quarz, (Dowex) und Puffer homogenisiert, und das Homogenat anschließend 20 min bei 12 000 x g zentrifugiert. Der über Glaswolle abfiltrierte Überstand diente zur Präparation der Mikrosomen.
Dazu wurde der Rohextrakt mit einer wässrigen 1 M $MgCl_2$-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 30 mM $Mg^{2+}$ versetzt, nach vorsichtigem Schwenken 10 min im Eisbad gehalten und anschließend 20 min bei 17 000 x g zentrifugiert (Diesperger et al., 1974). Das mikrosomale Sediment wurde in 1/20 (bzw. 1/40 beim Nachweis der Zimtsäure-4-Hydroxylase) des Fällvolumens in Extraktionspuffer suspendiert und in einem Glashomogenisator vorsichtig homogenisiert.
Neben der Präzipitation mit $Mg^{2+}$ wurden die Mikrosomen auch durch Ultrazentrifugation bei 90 000 x g (75 min) gewonnen. Die Weiterbehandlung des mikrosomalen Sediments erfolgte wie oben beschrieben.

## 3. Bestimmung der Enzymaktivitäten

### 3.1. Zimtsäure-4-Hydroxylase

Die Reaktionsmischung mit einem Gesamtvolumen von 150 µl enthielt:
15 µmol K-Pi pH 7.5, 28 - 140 nmol 2-Mercaptoäthanol,
111 000 dpm (3- $^{14}C$)t-Zimtsäure (111 000 dpm/5 µl, 1.85 GBq/mmol),
120 nmol t-Zimtsäure, 10 - 50 µg Protein (Mikrosomenfraktion) und 120 nmol NADPH .
Nach Abdampfen des organischen Lösungsmittels wurde die radioaktiv markierte t-Zimtsäure in Puffer, der die kalte t-Zimtsäure enthielt, aufgenommen. Die Mikrosomensuspension wurde mit

der t-Zimtsäure-Mischung zuerst 5 min bei 30°C vorinkubiert; danach erfolgte der Start der Enzymreaktion durch Zugabe von NADPH. Nach einer Inkubationszeit von 10 - 30 min bei 30°C und geöffneten Eppendorfgefäßen wurden 20 µl Stoplösung (je 2 mg t-Zimtsäure und p-Cumarsäure /ml Essigsäure) zugegeben und die phenolischen Substanzen zweimal mit Äthylacetat (100 µl + 50 µl) extrahiert. Die vereinten Äthylacetat-Extrakte wurden auf Kieselgel DC-Platten aufgetragen und in Benzol/Eisessig (8/2) chromatographiert.

3.2. Flavanon-Oxidase

In einem Gesamtvolumen von 200 µl waren enthalten: 20 µmol K-Pi pH 7.5, 0.56-1.4 µmol 2-Mercaptoäthanol, 10 000 cpm ($^{14}$C) Naringenin bzw. ($^{14}$C) Eriodictyol (0.06 nmol, 3,09 GBq/mmol), 10-50 µg Protein (Mikrosomenfraktion) und 0.1 µmol NADPH . Das Reaktionsgemisch wurde 15-30 min bei 30°C in offenen Eppendorfgefäßen inkubiert und danach die Reaktion durch Zugabe von je 10 µg NAR, API, ERI und LUT(+) in je 10µl MeOH gestoppt. Die Flavonoide wurden zweimal mit Äthylacetat ausgeschüttelt und auf einer DC-Platte in 30% HOAc oder CAW(++) chromatographiert.

3.3. Flavanon-3-Hydroxylase

Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 200 µl: 19 µmol K-Pi (pH 7.5) oder Tris/HCl (pH 7.5), 0.28-1.96 µmol 2-Mercaptoäthanol, 10 000 cpm ($^{14}$C) Naringenin bzw. ($^{14}$C) Eriodictyol (0.06 nmol, 3.09 GBq/mmol), 10-100 µg Protein (Rohextrakt oder Rohextrakt nach Gelfiltration), 50 nmol 2-Oxoglutarat, 1 µmol Ascorbat, 10 nmol $Fe^{2+}$ (in $H_2O$). Nach 10-30 min Inkubation des Reaktionsgemischs in offenen Eppendorfgefäßen bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von je 10 µg NAR und DHK bzw. ERI und DHQ in je 10 µl MeOH gestoppt. Die Flavonoide wurden zweimal mit Äthylacetat (100 µl + 50 µl) extrahiert und in CAW chromatographisch getrennt.

---

(+) Abkürzungen: siehe S. 22

(++) Laufmittel: siehe S. 17

3.4. Flavonoid-3′-Hydroxylase

In 200 µl Gesamtvolumen waren enthalten:
20 µmol K-Pi (7.5), 0.28-1.96 µmol 2-Mercaptoäthanol,
10 000 cpm ($^{14}$C)Naringenin bzw. ($^{14}$C)Dihydrokämpferol
(0,06 nmol, 3.09 GBq/mmol),
5-40 µg Protein (Mikrosomensuspension) und 0.1 µmol NADPH.
Das Reaktionsgemisch wurde 5-10 min bei 30°C in offenen Eppendorfgefäßen inkubiert und danach die Reaktion mit je 10 µg NAR und ERI bzw. DHK und DHQ in je 10 µl MeOH abgestoppt. Die Flavonoide wurden zweimal mit Äthylacetat (100 µl + 50 µl) extrahiert und in CAW chromatographiert.

3.5. Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 200 µl:
20 µmol K-Pi (pH 7.5), 0.28-2.24 µmol 2-Mercaptoäthanol,
10 000 cpm ($^{14}$C) Naringenin bzw. ($^{14}$C) Dihydrokämpferol (0,06 nmol, 3,09 GBq/mmol), 10-80 µg Protein (Mikrosomensuspension) und 0.1 µmol NADPH.
Das Inkubationsgemisch wurde nach 5-30 min bei 30°C in offenen Eppendorfgefäßen mit je 10 µg der zu erwartenden Flavonoide abgestoppt, die in einer Konzentration von 1 mg/ml MeOH gelöst waren. Die Flavonoide wurden zweimal mit Äthylacetat (100 µl + 50 µl) ausgeschüttelt und in CAW chromatographisch getrennt.

4. Enzymatische Synthese radioaktiver Substrate

4.1. (4a,6,8 - $^{14}$C) Naringenin

Die Synthese von ($^{14}$C) Naringenin erfolgte mit einer Ammoniumsulfat (45-80%) gefällten Enzympräparation aus Petroselinum hortense, die Chalkonsynthase- und Chalkonisomerase-Aktivität enthielt. Die Enzympräparation wurde vor Gebrauch durch Gelfiltration über Sephadex G-50 entsalzt.
(2-$^{14}$C)Malonyl-CoA (2.22 GBq/mmol) wurde mit unmarkiertem Malonyl-CoA auf eine spezifische Aktivität von 1.03 GBq/mmol verdünnt.
p-Cumaroyl-CoA wurde nach der Methode von Stöckigt und Zenk (1975) und nach persönlicher Mitteilung von Dr. R. Sütfeld (Münster) und

Dr. W. Heller (Freiburg) synthetisiert. Zur Synthese größerer Mengen an radioaktiv markiertem Naringenin wurden 4 Parallelansätze des folgenden Reaktionsgemischs angesetzt:

400 µl 0.1 M K-Pi pH 7.5
50 µl Chalkonsynthase-Präparation
25 µl p-Cumaroyl-CoA (5 nmol)
25 µl (2-$^{14}$C) Malonyl-CoA (7.5 nmol, 1.03 GBq/mmol)

Nach Inkubation von 1h bei 30°C wurde das Naringenin dreimal mit Äthylacetat (150 µl, 100 µl, 50 µl) extrahiert, die Äthylacetat-Extrakte der 4 Testansätze wurden vereinigt und davon ein Aliquot von 10 000 cpm auf einer DC-Platte in 15% HOAc chromatographiert. Das Chromatogramm zeigte in den meisten Fällen außer Naringenin nur eine geringe Menge an Nebenprodukten (I Rf 8, II Rf 52), so daß das synthetisierte Naringenin nicht weiter gereinigt werden mußte. Falls die Nebenprodukte jedoch in größeren Mengen auftraten, wurde der gesamte Äthylacetat-Extrakt als Bande auf eine DC-Platte aufgetragen und in 15% HOAc chromatographiert. Die dem Naringenin entsprechende Bande wurde ausgekratzt und mit MeOH eluiert.
In 4 Parallelansätzen konnten insgesamt ca 410 000 dpm ($^{14}$C) Naringenin synthetisiert werden; das entspricht bei einer spezifischen Aktivität von 3.09 GBq/mmol 2.2 nmol.
Das in Äthylacetat oder Methanol gelöste Naringenin konnte monatelang bei -20°C aufbewahrt werden. Unmittelbar vor Gebrauch wurde das Lösungsmittel an der Wasserstrahl- oder Ölpumpe abgezogen und das Naringenin in Testpuffer aufgenommen.

4.2. (4a,6,8-$^{14}$C) Eriodictyol

Radioaktiv markiertes Eriodictyol konnte ebenfalls mit Hilfe der Chalkon-Synthase Präparation aus Petersilie-Zellkulturen synthetisiert werden.
Statt p-Cumaroyl-CoA diente Kaffeoyl-CoA als Substrat, die Synthese wurde bei pH 6.8 durchgeführt. Die übrigen Testbedingungen und die Durchführung entsprachen der Synthese von Naringenin.
In 4 Parallelansätzen (s. 4.1.) konnten ca 187 000 dpm ($^{14}$C) Eriodictyol (3.09 GBq/mmol) synthetisiert werden.

4.3. (4a,6,8-$^{14}$C) Dihydrokämpferol

Radioaktiv markiertes Dihydrokämpferol wurde in einem kombinierten Chalkon-Synthase- und Flavanon-3-Hydroxylase-Ansatz mit der Ammoniumsulfat gefällten Enzympräparation aus Petersilie-Zellkulturen synthetisiert (Britsch, 1981).
Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 500 ul:

250 µl 0.1 M Tris/HCl pH 7.5
100 µl Enzympräparation aus Petersilie-Zellkulturen
25 µl p-Cumaroyl-CoA (5 nmol)
25 µl (2-$^{14}$C) Malonyl-CoA (7.5 nmol, 1.03 GBq/mmol)

Inkubation bei 30°C, nach 5 min Zugabe von:

50 µl 2-Oxoglutarat (125 nmol)
50 µl $FeSO_4$ (25 nmol)

Das Reaktionsgemisch wurde in offenen Eppendorfgefäßen 2h bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe einer Spatelspitze EDTA wurden die Enzymreaktionen abgestoppt und nach Ultraschallbehandlung (2 min) die Flavonoide dreimal mit Äthylacetat (150 µl, 100 µl, 50 µl) extrahiert. Die von 4 Parallelansätzen vereinten Äthylacetat-Extrakte wurden als Band auf eine DC-Platte aufgetragen und in 15% HOAc chromatographiert. Die dem Dihydrokämpferol entsprechende Bande (Rf 52) wurde ausgekratzt und portionsweise mit MeOH eluiert.
In 4 Testansätzen konnten insgesamt ca 202 000 dpm Dihydrokämpferol (3.09 GBq/mmol) synthetisiert werden.
Lagerung und Präparation für den Test siehe 4.1.

4.4. (4a,6,8-$^{14}$C) Dihydroquercetin

Zur Synthese von Dihydroquercetin wurde ($^{14}$C) Eriodictyol als Substrat in den Flavanon-3-Hydroxylase Test (3.3.) eingesetzt. Als Enzymquelle diente ein Rohextrakt (2.1.) aus Matthiola incana Linie 17. Nach Chromatographie in CAW wurde das Dihydroquercetin mit MeOH eluiert.

4.5. (4a,6,8-$^{14}$C) Apigenin

Radioaktiv markiertes Apigenin wurde im Flavanon-Oxidase-Test (3.2.) mit Naringenin als Substrat und mit einer Mikrosomenfraktion aus roten Löwenmaul-Blüten als Enzymquelle synthetisiert. Nach Chromatographie in 30 % HOAc wurde das Apigenin mit MeOH eluiert.

4.6. (4a,6,8-$^{14}$C) 3',4',5',5,7-Pentahydroxyflavanon

Die Synthese wurde wie unter 3.5. beschrieben durchgeführt. Als Enzymquelle diente eine aus blauen Blüten von Verbena hybrida, Lathyrus odoratus oder Petunia hybrida präparierte Mikrosomenfraktion.

## 5. Chromatographie

Die Chromatographie wurde auf Dünnschicht-Platten durchgeführt. Dabei dienten Kieselgel 60 $F_{254}$-Platten (Schichtdicke 0.25 mm, Merck) zur Trennung von Zimtsäuren und Cellulose-Platten (Schichtdicke 0.1 mm, Schleicher & Schüll) zur Trennung von Flavonoiden.

### 5.1. Laufmittel

Folgende Laufmittel wurden benutzt (Angaben in Volumenprozent):
CAW: Chloroform/Essigsäure/$H_2O$ (50/45/5)
30% HOAc : Essigsäure/$H_2O$ (30/70)
15% HOAc : Essigsäure/$H_2O$ (15/85)
Forestal : Essigsäure/HCl/$H_2O$ (30/3/10)
BAW : Butanol/Essigsäure/$H_2O$ (4/1/5; Oberphase)
TBA : tert. Butanol/Essigsäure/$H_2O$ (3/1/1)
Benzol/Essigsäure (8/2)

### 5.2. Rf-Werte

Tabelle II gibt eine Gesamtübersicht über die durchschnittlichen Rf-Werte aller an den Enzymreaktionen beteiligten Flavonoide.

Tab. II: Rf-Werte (x100) der an den Enzymreaktionen beteiligten Flavonoide in verschiedenen Laufmitteln

| Substanz | CAW | 15% HOAc | 30% HOAc | Forestal | BAW | TBA |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Naringenin | 83 | 41 | 61 | 91 | 92 | 90 |
| Eriodictyol | 60 | 35 | 54 | 81 | 87 | 86 |
| Pentahydroxy-flavanon | 26 | | 48 | 74 | | |
| Dihydrokämpferol | 65 | 59 | 70 | 86 | 90 | 88 |
| Dihydroquercetin | 37 | 56 | 67 | 79 | 85 | 74 |
| Dihydromyricetin | 15 | | 62 | 71 | | |
| Kämpferol | | 06 | | | 87 | 80 |
| Quercetin | | 03 | 08 | 41 | 75 | 60 |
| Myricetin | | | 04 | 26 | | |
| Apigenin | 76 | | 21 | 76 | | |
| Luteolin | 43 | 08 | 12 | 58 | 83 | 81 |
| Tricetin | 10 | | | | | |

6. Nachweis der Vergleichssubstanzen

Die Lage der authentischen Zimtsäuren und Flavonoide auf der DC-Platte wurde unter UV-Licht bestimmt. In einigen Fällen war die Platte zuvor mit $NH_3$ bedampft worden. Zum spezifischen Nachweis von Flavanonen wurde die Reduktion mit Borhydrid und nachfolgender HCl-Bedampfung durchgeführt (Eigen et al., 1957). Dihydroflavonole wurden mit Zinkstaub und nachfolgender Besprühung mit 6 N HCl angefärbt (Barton, 1968).

7. Charakterisierung der Reaktionsprodukte

7.1. Nachweis

Die Lage der radioaktiven Produkte auf der DC-Platte wurde mit dem DC-Scanner II LB 2723 (Berthold) oder mit der Beta-Kamera BF 290 (Berthold) bestimmt.

7.2. Identifizierung

a) Rechromatographie:
Die dem radioaktiven Produkt entsprechende Bande wurde ausgekratzt und die Substanz mit MeOH eluiert. Das Lösungsmittel wurde unter $N_2$-Begasung oder an der Vakuumpumpe abgedampft, der Rückstand in wenig MeOH aufgenommen und mit authentischen Flavonoiden in verschiedenen Laufmitteln chromatographiert.

b) enzymatische Umsetzung:
Flavanone wurden durch die enzymatische 3-Hydroxylierung zu den entsprechenden Dihydroflavonolen mit einem Rohextrakt aus Matthiola incana identifiziert; ferner auch durch die enzymatische Umsetzung zu den entsprechenden Flavonen mit einer Mikrosomenfraktion aus roten Löwenmaul-Blüten.

c) chemische Umwandlung:
Dihydroflavonole konnten durch Oxidation mit Metabisulfit zu den entsprechenden Flavonolen identifiziert werden (Kho et al., 1975). Dazu wurde die Substanz mit 20% Metabisulfit 2h bei 95°C inkubiert. Die Flavonoide wurden anschließend mit Äthylacetat ausgeschüttelt und chromatographiert.

### 7.3. Quantitative Auswertung

Die radioaktive Zone wurde entweder von der DC-Platte abgekratzt oder nach Behandlung mit Strip-mix (Redgwell et al., 1974) von der Platte abgehoben und mit 5 ml Unisolve I versetzt. Die Radioaktivität wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard, Tri-carb; Zählausbeute: 91%) gemessen.

### 8. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt und in der Mikrosomenfraktion wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt.

### 9. Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung der pH-Optima der Enzymaktivitäten wurde 0.1 M K-Pi von pH 6.5 bis pH 8.5 eingesetzt. Folgende Volumenverhältnisse von Enzymlösung zu Puffer wurden gewählt:
15 µl Enzymlösung + 135 µl Puffer (bei Zimtsäure-4-Hydroxylase)
10 µl Enzymlösung + 190 µl Puffer (bei allen übrigen Enzymtests)
Durch die Verwendung geringer Volumina der Enzymlösung konnte eine pH-Verschiebung weitgehend ausgeschlossen werden.

### 10. Chemische Synthese der Zimtsäure-CoA-Ester

Die chemische Synthese von p-Cumaroyl-CoA und Kaffeoyl-CoA wurde nach der Methode von Stöckigt und Zenk (1975) und nach persönlicher Mitteilung von Dr. R. Sütfeld (Münster) und Dr. W. Heller (Freiburg) über die entsprechenden N-Hydroxysuccinimidester durchgeführt.

### 11. Isolierung von Flavonoiden

Die im Handel nicht erhältlichen Vergleichssubstanzen wurden aus Blüten bzw. Blättern verschiedener Pflanzen gewonnen.
Die Isolierung von Dihydrokämpferol erfolgte aus Matthiola incana (Linie 09), die von Dihydromyricetin aus blauen Blüten von Verbena hybrida.

3',4',5',5,7-Pentahydroxyflavanon konnte erstmalig in Brakteen von Helichrysum bracteatum nachgewiesen werden (Forkmann, 1983). Die Präparation größerer Mengen erfolgte aus dem entsprechend substituierten Chalkonglucosid, das in gelben Blüten dieser Gattung angereichert wird. Das 3',4',5', 5,7 -hydroxylierte Flavanon wurde chromatographisch, spektroskopisch und durch Vorstufen-Versuche charakterisiert.

Das 3',4',5'-hydroxylierte Flavon Tricetin konnte aus Blättern von Lathyrus pratensis in ausreichender Menge gewonnen werden (Lamer et al., 1968).

## 12. Chemikalien und Naturstoffe

Amersham-Buchler, Braunschweig:
(2-$^{14}$C)Malonyl-CoA, 2,22 GBq/mmol
Böhringer Mannheim GmbH, Mannheim:
NADPH
NADH
CEA, Gif-sur-Yvette:
(3-$^{14}$C)Zimtsäure, 1,85 GBq/mmol
Fluka AG, Buchs SG:
t-Zimtsäure
Pharmacia Fine chemicals, Uppsala:
Sephadex G-50 fine
Roth, Karlsruhe:
L(+)-Ascorbinsäure, Natriumsalz
2-Oxoglutarsäure
p-Cumarsäure
Naringenin
Dihydroquercetin
Apigenin
Luteolin
Sarget, Lyon:
Eriodictyol
Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg:
Serva Blue G
2-Mercaptoäthanol
Dowex 1x2 (200 - 400 mesh)

EDTA
Diäthylpyrocarbonat
Polyvinylpyrrolidon

Sigma, St. Louis:
p-Chloromercuribenzoat
Malonyl-CoA, Trilithiumsalz

Zinsser, Frankfurt:
Unisolve I

Alle weiteren Chemikalien stammten von Merck, Darmstadt und waren von p.A.-Qualität.

## 13. Abkürzungen

| | |
|---|---|
| API | Apigenin |
| Cy | Cyanidin |
| DHK | Dihydrokämpferol |
| DHQ | Dihydroquercetin |
| DHM | Dihydromyricetin |
| DDC | Diäthyldithiocarbamat |
| DPC | Diäthylpyrocarbonat |
| Dp | Delphinidin |
| EDTA | Äthylendiamintetraessigsäure |
| ERI | Eriodictyol |
| HOAc | Essigsäure |
| Km | Kämpferol |
| K-$P_i$ | Kalium-Phosphat |
| LUT | Luteolin |
| MeOH | Methanol |
| NAR | Naringenin |
| NADH | Nicotinamid-adenin-dinucleotid |
| NADPH | Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat |
| Pg | Pelargonidin |
| pCMB | p-Chloromercuribenzoat |
| PHF | Pentahydroxyflavanon |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| Qu | Quercetin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan |

# III. ERGEBNISSE

## Zimtsäure-4-Hydroxylase

Die enzymatische Hydroxylierung der t-Zimtsäure in der para-Position des aromatischen Rings ist ein wichtiger Schritt in der Biosynthese von pflanzlichen Phenolkörpern wie Ligninen, Tanninen, phenolischen Säuren und Flavonoiden. Das für diese Hydroxylierung verantwortliche Enzym, die Zimtsäure-4-Hydroxylase, ist schon seit langem bekannt und mittlerweile sehr gut charakterisiert.
Für die vorliegende Arbeit schien es sinnvoll, an Hand dieses bekannten Enzyms erste Erfahrungen mit hydroxylierenden Enzymen aus Blüten zu sammeln.

Die Zimtsäure-4-Hydroxylase wurde zuerst von Nair und Vining (1965) und von Russell und Conn (1967) in Erbsenkeimlingen nachgewiesen und charakterisiert.
Es handelt sich dabei um ein mikrosomales Multienzymsystem, das Cytochrom P-450 enthält. Es führt ein Atom des molekularen Sauerstoffs in das Substrat ein, während das zweite zu $H_2O$ reduziert wird. Als Kofaktor (Wasserstoffdonator) dient NADPH. Aufgrund dieser Eigenschaften wird die Zimtsäure-4-Hydroxylase zu den mischfunktionellen Oxygenasen oder Monooxygenasen gerechnet.
Außer in Erbsenkeimlingen ist die Zimtsäure-4-Hydroxylase mittlerweile auch in Keimlingen von Buchweizen und Sorghum, in Kartoffelknollen, Artischocken und Sojabohnen und in Zellkulturen von Petroselinum hortense und Daucus carota nachgewiesen worden. Damit liegen Daten über das Enzym aus einer Reihe verschiedener Zelltypen vor; das Enzym aus Blüten war dabei allerdings noch nicht untersucht worden.
Die Untersuchungen an Blüten sollten deshalb zeigen, ob die Zimtsäure-4-Hydroxylase auch in diesem Gewebe die gleichen Eigenschaften besitzt wie in den bisher untersuchten Zelltypen.

Ein geeignetes Versuchsobjekt für den Nachweis und die Charakterisierung der Zimtsäure-4-Hydroxylase stand in einer

weißblühenden Linie (Linie 17) von Matthiola incana zur Verfügung. In dieser Linie war sowohl die Phenylalanin-Ammonia-Lyase als auch die p-Cumarat: CoA-Ligase schon mit Erfolg nachgewiesen worden.

Nachweis und Eigenschaften der Zimtsäure-4-Hydroxylase aus Blüten von M. incana (Linie 17).

Da es sich bei der Zimtsäure-4-Hydroxylase - wie in der Literatur beschrieben - um ein membrangebundenes Enzym handelt, wurde aus den Blüten die Mikrosomenfraktion präpariert (Diesperger et al., 1974). Nach Inkubation der Mikrosomen mit ($^{14}$C)-t-Zimtsäure und NADPH zeigte das Radiochromatogramm nach Chromatographie in Benzol/Eisessig ein neues radioaktives Produkt mit einem Rf-Wert von 54. Dies entsprach der Wanderungsstrecke der zugesetzten p-Cumarsäure.
Die Synthese von p-Cumarsäure war NADPH-abhängig; ohne diesen Kofaktor konnte die t-Zimtsäure nicht umgesetzt werden.

Die Enzymreaktion verlief bis ungefähr 80 µg Protein pro Testansatz linear. Mit höheren Proteinmengen ließ sich die Synthese von p-Cumarsäure nur noch geringfügig steigern.

Die Zeitabhängigkeit der Hydroxylierungsreaktion wurde mit Inkubationszeiten von 5 - 60 min verfolgt. Schon nach 5 - 10 min war die Reaktion nicht mehr linear. Eine Testreihe mit unterschiedlich langer Vorinkubation der Mikrosomenfraktion bei 30°C zeigte, daß die Enzymaktivität mit zunehmender Vorinkubationszeit stark abnimmt, so daß nach 34 min nur noch 50% der anfänglichen Enzymaktivität vorhanden sind. Das deutete darauf hin, daß der mikrosomale Enzymkomplex bei 30°C relativ instabil ist, so daß schon nach kurzer Inkubationszeit zwischen Produktbildung und Zeit keine Linearität mehr besteht.

In 0.1 M K-Pi-Puffer zeigte die Zimtsäure-4-Hydroxylase um pH 8.0 maximale Aktivität (Abb. 3).

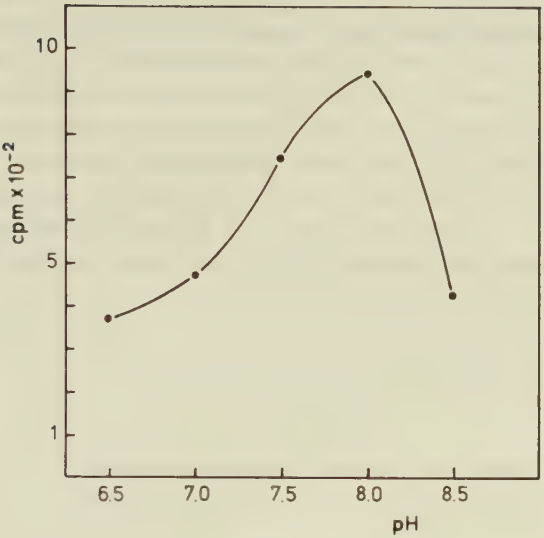



Abb. 3: pH-Abhängigkeit der Zimtsäure-4-Hydroxylase-Aktivität.

Um das Blütenstadium zu ermitteln, in dem optimale Enzymaktivität erwartet werden kann, wurde der Aktivitätsverlauf der Zimtsäure-4-Hydroxylase über die Blütenentwicklung untersucht. Aufgrund morphologischer Kriterien wurden folgende Stadien unterschieden:

Stadium 1: Eine kurze, gelblich-weiße Petalenspitze ragt aus den Kelchblättern heraus.

Stadium 2: Die Knospe ist ca 1.5 cm lang; die Petalen sind fest eingerollt.

Stadium 3: Die Petalen lösen sich voneinander; die Knospenspitze ist leicht geöffnet.

Stadium 4: Die Petalen sind in einem Winkel von ca $90^{o}$ geöffnet.

Stadium 5: Die Blüte ist weit geöffnet; die Petalen stehen waagrecht nach außen.

Stadium 6: Die Blüte zeigt Welkerscheinungen; der Fruchtknoten wird sichtbar.

Für den in Abb. 4 dargestellten Aktivitätsverlauf der Zimtsäure-4-Hydroxylase wurden die Enzymaktivitäten auf das Frischgewicht bezogen. Ein im Prinzip ähnlicher Verlauf ergab sich aber auch unter Berücksichtigung des Proteingehalts. Der Aktivitätsverlauf beschreibt eine deutliche Optimumkurve (Abb. 4). In Stadium 1 ist die Enzymaktivität noch sehr gering. Danach steigt sie steil an und erreicht in Stadium 4, in dem die Petalen in einem Winkel von ca $90^{o}$ zueinander stehen, ihr Maximum. Von diesem Zeitpunkt an nimmt die Aktivität wieder kontinuierlich ab.

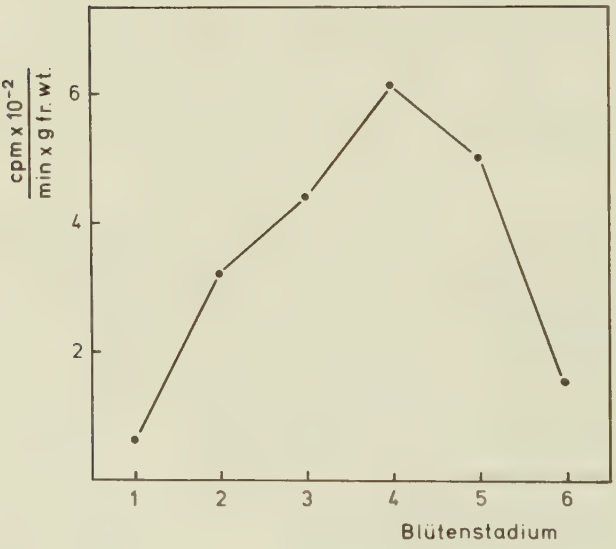



Abb. 4: Verlauf der Zimtsäure-4-Hydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit von der Blütenentwicklung.

Aus den Untersuchungen über die Zimtsäure-4-Hydroxylase konnten folgende Erfahrungen für die Präparation einer membrangebundenen Hydroxylase gesammelt werden.

- Zur Präparation der Mikrosomen sind mindestens 3-5 g Blüten erforderlich.
- Die Präparation der Mikrosomenfraktion aus Blüten gelingt sowohl durch Ultrazentrifugation als auch durch $Mg^{2+}$-Präzipitation.
- Die Mikrosomen sind bei $30^{o}C$ relativ instabil.
- Das Blütenstadium beeinflußt entscheidend die Aktivität des Enzyms.

## A. Oxidations-Reaktionen am Heterozyklus

Die verschiedenen Flavonoid-Klassen sind durch einen unterschiedlichen Oxidationszustand des heterozyklischen Rings gekennzeichnet.

### I. Flavanon-3-Hydroxylase

Flavanone und Dihydroflavonole sind wichtige Zwischenprodukte in der Anthocyanbiosynthese. Dihydroflavonole entstehen durch Hydroxylierung von Flavanonen in 3-Position des Heterozyklus. Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym, die Flavanon-3-Hydroxylase, wurde zum erstenmal von Forkmann et al. (1980) in Blüten von Matthiola incana nachgewiesen werden.

Die Flavanon-3-Hydroxylase aus Matthiola incana setzte sowohl Naringenin (NAR) als auch Eriodictyol (ERI) in das entsprechende Dihydroflavonol Dihydrokaempferol (DHK) bzw. Dihydroquercetin (DHQ) um (Abb. 5).

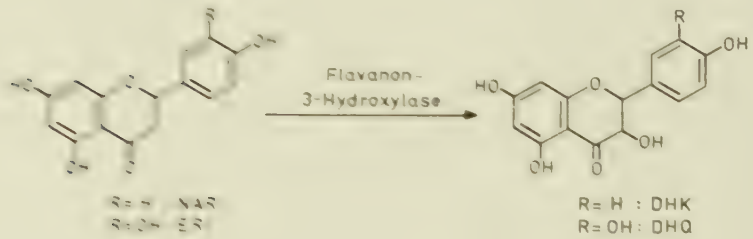



Abb. 5: Die von der Flavanon-3-Hydroxylase katalysierte Umwandlung von Flavanonen zu Dihydroflavonolen.

Als Kofaktoren benötigte die 3-Hydroxylase 2-Oxoglutarat, Ascorbat und $Fe^{2+}$.
Die Enzymreaktion wurde durch KCN, EDTA und DDC stark gehemmt und ihr pH-Optimum lag bei pH 7.5.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ergänzende Untersuchungen zur Abhängigkeit von Mercaptoäthanol und zur Aktivität im Verlauf der Blütenentwicklung durchgeführt.

## 1.1. Ergänzende Untersuchungen zur Flavanon-3-Hydroxylase aus Matthiola incana

### 1.1.1. Pflanzenmaterial

Matthiola incana ist ein schon seit langem genetisch eingehend bearbeitetes Objekt. Grundlegende Arbeiten wurden seit den 30-iger Jahren von Kappert und seinen Schülern durchgeführt. Seyffert bearbeitete das Material kontinuierlich weiter, so daß mittlerweile am hiesigen Institut eine große Anzahl weißblühender und farbiger Linien vorliegt, die bezüglich einiger die Anthocyansynthese betreffende Gene charakterisiert sind (Seyffert, 1971).
Zur Anthocyansynthese sind 3 komplementär wirkende Loci f, e, g erforderlich, die durch mindestens je ein Wildtypallel vertreten sein müssen (Kappert, 1949). Weiße Blüten, in denen rezessive Allele am Locus f vorliegen, enthalten hauptsächlich Zimtsäureglykoside, während in weißblühenden Genotypen mit rezessiven Allelen am Locus e oder g Flavonolglykoside angereichert werden (Ritter-Thomas, 1973).

Die Untersuchungen zur Flavanon-3-Hydroxylase wurden an 2 farbigen und 2 weißblühenden Linien durchgeführt (Tab. III).

Tab. III: Die chemogenetische Charakterisierung der untersuchten Genotypen von Matthiola incana.

| Linie | Genotyp | Blütenfarbe | Endprodukte |
|---|---|---|---|
| 04 | $f^+f^+$ $e^+e^+$ $g^+g^+$ | leuchtend lila | acylierte Cyanidinglykoside |
| 16 | $f^+f^+$ $e^+e^+$ $g^+g^+$ | stumpf braun-rot | Pelargonidinglykoside |
| 17 | $f^+f^+$ e e $g^+g^+$ | weiß | Flavonolglykoside |
| 18 | f f $e^+e^+$ $g^+g^+$ | weiß | Zimtsäureglykoside |

### 1.1.2. Einfluß der Mercaptoäthanolkonzentration auf die Enzymaktivität

Um die Abhängigkeit der Enzymaktivität von Mercaptoäthanol zu untersuchen, wurden Rohextrakte mit unterschiedlichen Mercaptoäthanolkonzentrationen präpariert. Der Puffer im Enzymtest enthielt kein Mercaptoäthanol.

Tab. IV: Die Synthese von Dihydrokämpferol (DHK) in Abhängigkeit von der Mercaptoäthanolkonzentration.

| Mercaptoäthanolkonzentration | | cpm in DHK[a] |
|---|---|---|
| bei der Präparation | im Test | |
| 28 mM | 3.5 mM | 2 852 |
| 21 mM | 2.62 mM | 2 747 |
| 14 mM | 1.75 mM | 3 166 |
| 7 mM | 0.85 mM | 2 397 |
| 0 mM | 0.0 mM | 1 812 |

[a] Synthese mit 50 µg Protein

Wie Tabelle IV zeigt, war die Enzymaktivität auch dann nachweisbar, wenn weder bei der Präparation noch im Enzymtest Mercaptoäthanol vorhanden war. Die Enzymaktivität konnte aber durch Gabe von Mercaptoäthanol gesteigert werden, maximal bei einer Konzentration von 14 mM.
Wurde die Enzympräparation ohne Mercaptoäthanol durchgeführt, im Enzymtest aber die Mercaptoäthanolkonzentration von 0 - 7 mM variiert, besaß die Enzymaktivität ebenfalls bei einer Konzentration von 2 mM ein leichtes Maximum. Die Mercaptoäthanolkonzentration hat offensichtlich auf die Aktivität der Flavanon-3-Hydroxylase keinen großen Einfluß. Bei einer Mercaptoäthanolkonzentration von ca 2 mM im Test erhält man zwar maximale Enzymaktivität, aber selbst bei völliger Abwesenheit von Mercaptoäthanol ist die Enzymaktivität nur um ca 40 % reduziert.

### 1.1.3. Enzymaktivität im Verlauf der Blütenentwicklung

Der Aktivitätsverlauf der Flavanon-3-Hydroxylase wurde über 8 Blütenstadien, von der noch ungefärbten, kleinen Knospe bis zur welkenden Blüte untersucht (Abb. 6).
Die Enzymaktivität wurde auf das Frischgewicht und nicht auf den Proteingehalt bezogen, da dieser von den jüngsten Knospen bis zu den ältesten Blüten drastisch abnimmt. Für die Chalkon-Synthase aus Matthiola incana konnte aber durch Immunpräzipitationsexperimente gezeigt werden, daß das Enzym in den ersten 5 Blütenstadien in ungefähr gleicher Menge vorhanden ist (Rall, persönl. Mitt.). Für den starken Abfall der Proteinkonzentration sind deshalb eher Proteine des Wachstums und der Entwicklung verantwortlich als die Enzyme der Flavonoid-Biosynthese.

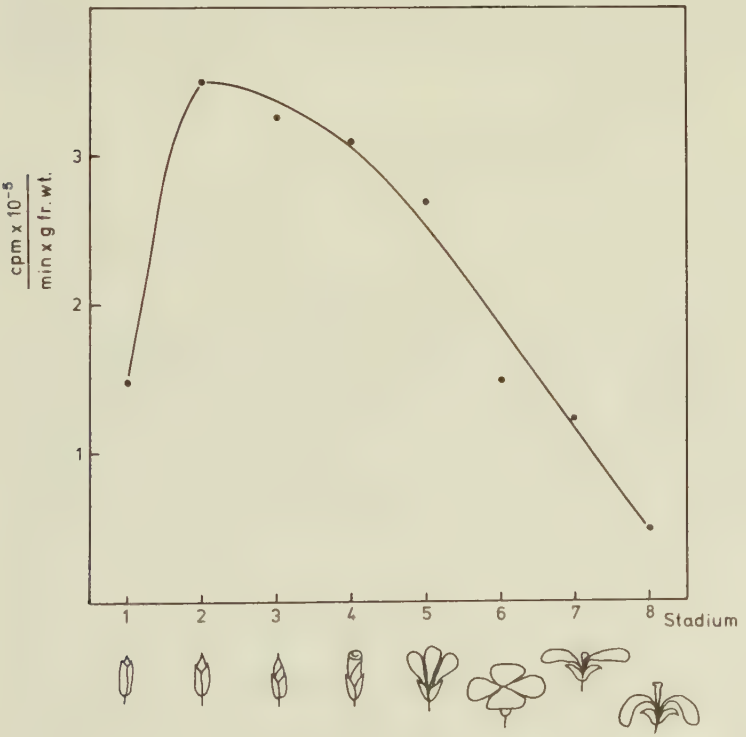



Abb. 6: Die Aktivität der Flavanon-3-Hydroxylase im Verlauf der Blütenentwicklung. Die Enzymaktivität wurde auf g Frischgewicht bezogen.

Es ergab sich folgender Aktivitätsverlauf (Abb. 6): Schon in der noch ungefärbten, wenige mm großen Knospe (Stadium 1) war die Enzymaktivität nachweisbar und das Aktivitätsmaximum war bereits im nächsten Stadium erreicht. Danach fiel die Aktivität kontinuierlich ab.

Nach dem ersten Nachweis der Flavanon-3-Hydroxylase in Matthiola incana wurden die Untersuchungen an anderen genetisch definierten Pflanzen (A. majus, Petunia hybrida) fortgesetzt, bei denen Gene bekannt sind, welche die Umwandlung der Flavanone zu den Dihydroflavonolen kontrollieren. Durch Korrelation dieser Gene mit der Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität sollte bewiesen werden, daß das Enzym für diesen Reaktionsschritt spezifisch ist.
Außerdem wurden weißblühende Mutanten verschiedener Pflanzengattungen untersucht, bei denen auf Grund chemischer Analysen vermutet werden konnte, daß die Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität ausgefallen ist.

## 1.2. Flavanon-3-Hydroxylase aus A. majus

### 1.2.1. Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen über die Flavanon-3-Hydroxylase wurden an 6 verschiedenen Genotypen durchgeführt (Tab. V).

Rezessive Allele am Locus niv blockieren die Anthocyansynthese und führen zur Anreicherung von Hydroxyzimtsäureglykosiden (Geissman und Harborne, 1955). Spribille und Forkmann (1982a) konnten zeigen, daß dieser Block auf einen Ausfall der Chalkonsynthase-Aktivität zurückzuführen ist. Das Gen sulf beeinflußt die Auronbildung. Wildtypallele dieses Gens unterdrücken die Auron-Synthese (Sherratt, 1958). Das Gen eos betrifft die Hydroxylierung des B-Rings in 3′-Position (s. B.1.2.1.).
Das Gen inc ist für die Flavanon-3-Hydroxylase von besonderer Bedeutung.
Zur Anthocyansynthese sind Wildtypallele am Locus inc erforderlich. Rezessive Allele führen zur Anreicherung von Flavanonen und Flavonen (Geissman et al., 1954).

Tab. V: Chemogenetische Charakterisierung der untersuchten Genotypen von A. majus und die genetische Kontrolle der Flavanon-3-Hydroxylase.

| Genotyp (homozygot) | Blüten-farbe | End-produkte | Zwischen-produkte | Flavanon-3-Hydro-xylase |
|---|---|---|---|---|
| Niv Sulf Inc eos | rosa | API, Km, Pg | NAR, DHK | + |
| Niv Sulf Inc Eos | purpur | API, LUT, Ch, Qu, Cy | NAR, ERI, DHK, DHQ | + |
| Niv Sulf inc Eos | elfen-bein | API, LUT, Ch | NAR, ERI | - |
| Niv sulf inc eos | gelb | Au, API | n.u. | - |
| Niv sulf Inc eos | orange | Au, API, Km, Pg | n.u. | + |
| niv Sulf Inc Eos | weiß | keine Flavonoide | | + |

Au=Aurones, Ch=Chrysoeriol, n.u.=nicht untersucht, weitere Abkürzungen siehe S. 22

Supplementation mit Dihydroflavonolen initiiert in der "incolorata" -Mutante (inc/inc) die Anthocyansynthese. Flavanone hingegen sind unwirksam (Stickland und Harrison, 1974; Harrison und Stickland, 1974). Diese Ergebnisse zeigen, daß das Gen inc offenbar den Schritt von den Flavanonen zu den Dihydroflavonolen kontrolliert. Da die Flavanon-3-Hydroxylase diese Reaktion katalysiert, sollte die Allelsituation am Locus inc die Aktivität dieses Enzyms beeinflussen.

1.2.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Die Präparation des Rohextrakts erfolgte vornehmlich aus dem rosa-blühenden Genotyp (Tab. V).

Nach Inkubation des Rohextrakts mit ($^{14}$C)Naringenin und anschließender Chromatographie in CAW zeigte das Radiochromato-

gramm ein neues radioaktives Produkt (Rf 65, Abb. 7). Durch Rechromatographie dieser Substanz in 3 weiteren Laufmitteln (15% HOAc, BAW, TBA) konnte sie als Dihydrokämpferol identifiziert werden (Rf-Werte siehe Tab. II). Eine weitere Bestätigung, daß es sich um DHK handelt, lieferte die Oxidationsreaktion des radioaktiven Produkts mit Metabisulfit zu Kämpferol (Kho et al., 1975).
($^{14}$C) Eriodictyol als Substrat führte zur Synthese von Dihydroquercetin, das in entsprechender Weise identifiziert wurde.

Die Präparation des Rohextraktes mit Dowex reduzierte die Enzymaktivität sehr stark gegenüber der Präparation mit PVP (Tab. VI).

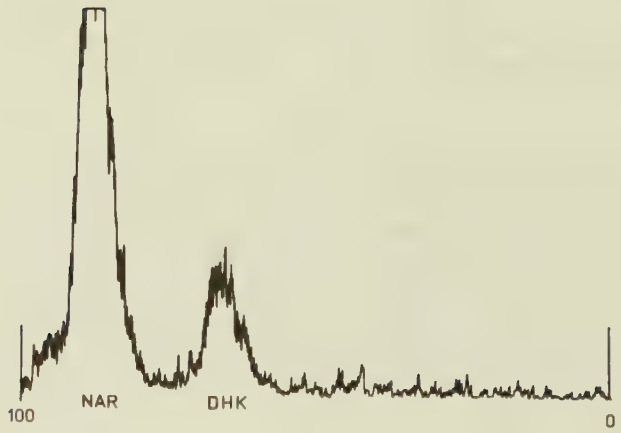



Abb. 7: Radiochromatogramm einer Inkubation von ($^{14}$C) NAR mit Rohextrakt aus dem rosa-blühenden Genotyp von A. majus.

Diese Beobachtung deutete darauf hin, daß die Enzymaktivität, wie bei Matthiola incana auch hier von niedermolekularen Kofaktoren abhängt, die durch Dowex eliminiert werden.
Zur Klärung der Kofaktorabhängigkeit wurde deshalb ein über Sephadex G-50 chromatographierter Rohextrakt mit unterschiedlichen Kombinationen von 2-Oxoglutarat, Ascorbat und $Fe^{2+}$ inkubiert (Tab. VI).
Die Kofaktoren einzeln gegeben stimulierten die Enzymaktivität nur gering. Die beste Enzymaktivität wurde mit 2-Oxoglutarat und Ascorbat erreicht. $Fe^{2+}$, das bei Matthiola incana als 3. Kofaktor nötig war, hatte offensichtlich auf das Enzym aus A. majus keinen stimulierenden Einfluß. Auch NADPH reduzierte die Enzymaktivität (Tab. VI). Dieser Effekt kann allerdings darauf zurückgeführt werden, daß bei Anwesenheit von NADPH NAR nicht nur zu DHK, sondern auch zu API umgesetzt wird (2.1.2.), und somit 2 Enzymreaktionen um das gleiche Substrat konkurrieren.
Im Gegensatz zur Flavanon-3-Hydroxylase aus Matthiola incana war die Enzymaktivität aus A. majus stark vom verwendeten Puffer abhängig. Während bei Verwendung von Tris/HCl-Puffer immer hohe Enzymaktivitäten beobachtet wurden, war in K-Pi-Puffer keine 3-Hydroxylase-Aktivität nachweisbar (Tab. VI). Maximale Aktivität konnte erreicht werden, wenn der Puffer für die Rohextraktpräparation zusätzlich 10 mM Ascorbinsäure enthielt (Tab. VI).

Da nach der Mikrosomenpräparation die gesamte Enzymaktivität im Überstand verblieb, während im mikrosomalen Sediment keine Aktivität nachweisbar war, ist die 3-Hydroxylase ein lösliches Enzym.

Untersuchungen zur Protein- und Zeitabhängigkeit der Enzymreaktion zeigten, daß die Reaktion bis zu ca 40 µg Protein und bis zu einer Inkubationszeit von 20 min linear verläuft.

Tab. VI: Abhängigkeit der Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität von den Präparationsbedingungen und den Kofaktoren.

| Enzymquelle | Kofaktor | 3-Hydroxylierung cpm in DHK[a] |
|---|---|---|
| Tris-HCl Puffer mit 10 mM Ascorbinsäure, Präparation mit PVP | – | 7 780 |
| | Ascorbat und 2-Oxoglutarat | 15 837 |
| | NADPH | 5 932 |
| obiger Ansatz nach Gelfiltration (G-50) | – | 463 |
| | Ascorbat | 663 |
| | 2-Oxoglutarat | 1 463 |
| | $Fe^{2+}$ | 391 |
| | Ascorbat und 2-Oxoglutarat | 15 659 |
| | Ascorbat, 2-Oxoglutarat und $Fe^{2+}$ | 10 182 |
| Tris-HCl Puffer Präparation mit PVP | – | 4 021 |
| | Ascorbat und 2-Oxoglutarat | 11 255 |
| | NADPH | 3 110 |
| Tris-HCl Puffer, Präparation mit Dowex 1x2 | – | 929 |
| | Ascorbat und 2-Oxoglutarat | 4 075 |
| K-Pi Puffer, Präparation mit PVP | – | 0 |
| | Ascorbat und 2-Oxoglutarat | 0 |

[a] Synthese mit 50 µg Protein

Das pH-Optimum für die Umsetzung von NAR zu DHK lag um pH 7.5.

Von den getesteten Inhibitoren reduzierten KCN, EDTA und DDC sehr stark die Enzymaktivität (Tab. VII).

Tab. VII: Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die 3-Hydroxylierung von Naringenin.

| Inhibitor | 3-Hydroxylierungs-Aktivität (%) |
|---|---|
| — | 100 |
| 1 mM EDTA | 24 |
| 2 mM EDTA | 21 |
| 2 mM KCN | 28 |
| 5 mM KCN | 14 |
| 2 mM DDC | 16 |
| 0,5 mM DPC | 78 |
| 0.1 mM pCMB | 81 |

1.2.3. Genetische Kontrolle

Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität konnte nicht nur im Rohextrakt aus rosa-gefärbten Blüten nachgewiesen werden, sondern auch in allen anderen Genotypen, in denen das Gen inc durch Wildtypallele vertreten war (Tab. V).

Dagegen war in Rohextrakten aus Genotypen mit rezessiven Allelen am Locus inc keine 3-Hydroxylase-Aktivität nachweisbar, obwohl die Aktivität anderer Enzyme (Chalkon-Synthase, Flavonoid-3′-Hydroxylase) beobachtet werden konnte. In Genotypen mit rezessiven Allelen (inc/inc) war die Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität auch dann nicht nachweisbar, wenn die Kofaktorkombination, der pH-Wert des Enzymtests oder die eingesetzten Proteinmengen variiert wurden. In Mischinkubationen, die Roh-

extrakte sowohl aus einem Genotyp mit Wildtypallelen als auch aus einem Genotyp mit rezessiven Allelen enthielten, verhielten sich die Enzymaktivitäten additiv. Das weist darauf hin, daß in rezessiven Genotypen kein löslicher Inhibitor der 3-Hydroxylase vorhanden ist.

## 1.3. Flavanon-3-Hydroxylase aus Petunia hybrida

### 1.3.1. Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen zur Flavanon-3-Hydroxylase wurden sowohl an Pflanzen aus dem Handelssortiment als auch an genetisch definiertem Pflanzenmaterial, das uns vom Genetischen Institut in Amsterdam überlassen worden war, durchgeführt (Tab. VIII).

Tab. VIII: Charakterisierung der untersuchten Sorten bzw. Linien und Nachweis der Flavanon-3-Hydroxylase.

| Sorte bzw. Linie | Blütenfarbe | Endprodukte | 3-Hydroxylase-Aktivität |
|---|---|---|---|
| "Red Titan" | rot | Cy-Derivate | + |
| "Blaue Glocke" | blau | Dp-Derivate | + |
| W 20 (An3/An3) | weiß | DHK- u. DHQ-Glykoside | + |
| W 37 (an3/an3) | weiß | NAR-Glykoside | - |
| W 39 (an3/an3) | weiß | NAR- u. ERI-Glykoside | - |
| R 3 (An3/An3) | hellrot | Cy- (Dp) Derivate | + |

Petunia hybrida wird seit vielen Jahren am Genetischen Institut in Amsterdam intensiv genetisch und chemogenetisch untersucht. In dieser Zeit konnte eine große Zahl von Genen, die die Flavonoid- und Anthocyanbiosynthese betreffen, identifiziert werden (Wiering et al., 1979).
Im Zusammenhang mit der Umwandlung von Flavanonen zu Dihydroflavonolen erscheint das Gen An3 besonders wichtig.

Zur Anthocyansynthese sind dominante Allele am Locus An3 erforderlich. In weißen Mutanten (an3/an3) kann durch Fütterung mit Dihydroflavonolen, nicht aber mit Flavanonen und Flavonolen Anthocyansynthese induziert werden (Kho et al., 1975). Somit betrifft das Gen An3 offensichtlich die Umwandlung der Flavanone zu den Dihydroflavonolen.
Petunia hybrida stellte deshalb ein weiteres geeignetes Objekt dar, in dem der Nachweis einer genetischen Kontrolle der Flavanon-3-Hydroxylase erbracht werden konnte.

1.3.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

In Rohextrakten aus hellroten Blüten war eine Enzymaktivität vorhanden, welche sowohl die Hydroxylierung von ($^{14}$C) NAR zu ($^{14}$C) DHK als auch die Hydroxylierung von ($^{14}$C) ERI zu ($^{14}$C) DHQ katalysierte. Sie ließ sich durch Zugabe von 2-Oxoglutarat, Ascorbat und $Fe^{2+}$ erheblich steigern (Tab. IX).

Zur Überprüfung der Kofaktorabhängigkeit wurde der Rohextrakt durch Gelfiltration von niedermolekularen Substanzen befreit und anschließend mit unterschiedlichen Kofaktorkombinationen inkubiert. Die Zugabe aller drei Kofaktoren 2-Oxoglutarat, Ascorbat und $Fe^{2+}$ führte zur maximalen Enzymaktivität (Tab. IX).

Der Nachweis der Aktivität gelang nicht nur in Tris-HCl Puffer, sondern auch in K-Pi Puffer.

EDTA, KCN und DDC, Inhibitoren der 3-Hydroxylase aus Matthiola und A. majus, konnten auch die Enzymaktivität aus Petunia deutlich herabsetzen. Gegenüber der Kontrolle ohne Inhibitor reduzierte EDTA (2 mM) die Enzymaktivität auf 23%, KCN (5 mM) auf 28% und DDC (2 mM) auf 16%.

Tab. IX: Kofaktorabhängigkeit der Flavanon-3-Hydroxylase aus Petunia hybrida.

| Enzymquelle | Kofaktoren | | | cpm in DHK[a] |
|---|---|---|---|---|
| | 2-Oxo-glutarat | Ascorbat | $Fe^{2+}$ | |
| Rohextrakt | - | - | - | 2 256 |
| | + | + | + | 6 453 |
| Rohextrakt nach Gelfiltration (Sephadex G-50) | - | - | - | 312 |
| | + | - | - | 7 500 |
| | - | + | - | 791 |
| | - | - | + | 9 811 |
| | + | + | - | 19 484 |
| | + | - | + | 19 894 |
| | - | + | + | 9 332 |
| | + | + | + | 20 627 |

[a] mit 25 µg Protein

1.3.3. Genetische Kontrolle

Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität war nicht nur in roten Typen vorhanden, sondern auch in allen anderen farbigen Typen aus dem Handelssortiment.

Der Beweis, daß die Flavanon-3-Hydroxylase auch in vivo für den Übergang von Flavanonen zu Dihydroflavanolen verantwortlich ist, konnte mit Hilfe der genetisch definierten Linien erbracht werden.

Während in Linien mit den Wildtypallelen von An3 (W 20, R 3) stets eine Enzymaktivität beobachtet wurde, war sie in den Linien mit den rezessiven Allelen (an3/an3) nie nachweisbar (Tab. VIII).

## 1.4. Weitere Flavanon-3-Hydroxylase Mutanten

Mutationen, die zu weißen Blüten führen, betreffen oft den letzten Schritt der Anthocyansynthese, nämlich die Umwandlung von Dihydroflavonolen zu Anthocyanen. Dagegen sind Mutationen, welche die Anthocyansynthese schon früher unterbrechen, offenbar ein in der Natur seltener vorkommendes Ereignis. So stellten weiße Blüten von A. majus (inc/inc) und Petunia hybrida (an3/an3) die ersten Beispiele für Mutanten dar, bei denen der Biosyntheseschritt Flavanon ⟶ Dihydroflavonol durch den Ausfall der Flavanon-3-Hydroxylase betroffen ist. Im Rahmen der Untersuchungen über die Flavanon-3-Hydroxylase schien es deshalb sinnvoll, nach weiteren Pflanzen zu suchen, bei denen dieser Schritt in der Anthocyansynthese blockiert ist.

### 1.4.1. Pflanzenmaterial

In die enzymatischen Untersuchungen über die 3-Hydroxylase wurden weiße und anthocyanhaltige Blüten von Streptocarpus, Verbena, Zinnia und Dahlia einbezogen (Tab. X).

Wie chromatographische Analysen der flavonoiden Inhaltsstoffe zeigten, akkumulieren weiße Blüten dieser Gattungen Flavone als einzige Flavonoid-Klasse.
Fütterungsexperimente mit DHQ führten in Blüten von Streptocarpus, Verbena und Zinnia zur Bildung von Anthocyan. Die Fütterung mit NAR konnte hingegen die Anthocyansynthese nicht initiieren.

Die Analyse der angereicherten Flavonoide und die Supplementationsexperimente ließen vermuten, daß in den weißen Blüten der genannten Pflanzengattungen die Anthocyansynthese nach Bildung der Flavanone blockiert ist.

Tab. X: Charakterisierung der untersuchten Pflanzengattungen.

| Pflanzengattung | Blüten-farbe | Endprodukte | Flavanon-3-Hydroxylase |
|---|---|---|---|
| Streptocarpus hybridus | | | |
| - | purpur | API, Cy, Pn | + |
| - | weiß | API, LUT | - |
| Verbena hybrida | | | |
| Blaze | hellrot | API, LUT, Pg, Cy | + |
| Crystal | weiß | API, LUT | - |
| Zinnia elegans | | | |
| Scarlet Flame | rot | API, Km, Qu, Pg, Cy | + |
| Purity | weiß | API, LUT | |
| Dahlia variabilis | | | |
| Lavender Perfection | lila | API, LUT, Cy | + |
| Sneezy | weiß | API, LUT | - |

Pn = Päonidin, weitere Abkürzungen siehe S. 22

### 1.4.2. Nachweis und Charakterisierung der Flavanon-3-Hydroxylase in den anthocyanhaltigen Blüten.

Mit Rohextrakten aus anthocyanhaltigen Blüten der 4 Pflanzengattungen (Tab. X) konnte in vitro Naringenin zu Dihydrokämpferol hydroxyliert werden. Neben Naringenin diente auch Eriodictyol als Substrat der 3-Hydroxylase aus Streptocarpus, Verbenen und Zinnien.
Zur Charakterisierung dieser Aktivität wurde die Kofaktorabhängigkeit der Enzymaktivität aus den verschiedenen Pflanzen untersucht.
Bei Inkubationen mit jeweils einem Kofaktor zeigte es sich, daß 2-Oxoglutarat die Enzymaktivität in allen Fällen außer bei Verbena stark stimulierte, während sowohl Ascorbat als auch $Fe^{2+}$ zu nur geringen Umsätzen führten (Tab. XI). Die effektivste Kofaktorkombination stellt bei Streptocarpus und Dahlia 2-Oxoglutarat und $Fe^{2+}$, bei Zinnia 2-Oxoglutarat und Ascorbat und bei Verbena 2-Oxoglutarat, Ascorbat und $Fe^{2+}$ dar (Tab. XI).

Hinsichtlich der Hemmbarkeit verhielten sich die Enzymaktivitäten aus den verschiedenen Pflanzen ebenfalls sehr ähnlich. Mit EDTA, KCN, DDC konnte in allen Fällen eine deutliche Hemmung der Enzymaktivität erreicht werden (Tab. XII).

Tab. XII: Einfluß von Inhibitoren auf die 3-Hydroxylierung von Naringenin.

| Inhibitor | 3-Hydroxylierungs-Aktivität (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Streptocarpus | Verbena | Zinnia | Dahlia |
| – | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2 mM EDTA | 18 | 0 | 9 | 55 |
| 5 mM KCN | 44 | 0 | 11 | 62 |
| 2 mM DDC | 28 | 0 | 5 | 35 |

Tab. XI: Kofaktorabhängigkeit der Flavanon-3-Hydroxylasen aus 4 verschiedenen Pflanzengattungen.

| Enzymquelle | Kofaktoren | | | cpm in Dihydrokämpferol/50 µg Protein | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2-Oxo-glutarat | Ascorbat | $Fe^{2+}$ | Strepto-carpus | Verbena | Zinnia | Dahlia |
| Rohextrakt | - | - | - | 3 575 | 0 | 259 | 819 |
| | + | + | + | 10 678 | 2 233 | 4 442 | 4 408 |
| Rohextrakt nach Gelfiltration (Sephadex G-50) | - | - | - | 670 | 0 | 0 | 223 |
| | + | - | - | 8 513 | 0 | 3 338 | 6 545 |
| | - | + | - | 2 061 | 0 | 0 | 806 |
| | - | - | + | 4 018 | 0 | 222 | 981 |
| | + | + | - | 19 610 | 421 | 7 383 | 4 275 |
| | + | - | + | 24 980 | 4 017 | 7 101 | 8 018 |
| | - | + | + | 13 999 | 0 | 1 119 | 2 342 |
| | + | + | + | 22 686 | 8 320 | 7 186 | 7 279 |

### 1.4.3. Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität in anthocyanhaltigen und anthocyanfreien Linien.

In Rohextrakten aus den in Tab. X aufgeführten, anthocyanhaltigen Blüten konnte die Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität ohne Schwierigkeiten nachgewiesen werden. Der Nachweis dieses Enzyms gelang ferner auch in anderen farbigen Typen dieser Pflanzengattungen.
Im Gegensatz dazu konnte mit Enzympräparationen aus weissen Blüten dieser Gattungen kein Umsatz von NAR beobachtet werden, während jedoch andere Enzymaktivitäten der Flavonoid-Biosynthese nachweisbar waren.

## 2. Flavanon-Oxidase

Die Untersuchungen über die Flavanon-3-Hydroxylase und Flavonoid-3′-Hydroxylase aus A. majus führten zum Nachweis einer weiteren Enzymaktivität, welche die Synthese von Flavonen katalysiert. Da die Flavone rein formal durch Oxidation von Flavanonen entstehen, wurde das Enzym als Flavanon-Oxidase bezeichnet.

### 2.1. Flavanon-Oxidase aus A. majus

#### 2.1.1. Pflanzenmaterial

In die Untersuchungen zur Flavanon-Oxidase wurden folgende Genotypen von A. majus einbezogen (siehe auch Tabelle V):

- Inc/Inc Eos/Eos (purpur)
- Inc/Inc eos/eos (rosa)
- inc/inc Eos/Eos (elfenbein)

Die Wirkungsweise des Gens inc wurde schon unter 1.2.1. beschrieben. Das Gen eos kontrolliert die 3′-Hydroxylierung des B-Rings. So führen dominante Allele am Locus eos zur Synthese von 3′,4′-hydroxylierten Flavanonen, Flavonen, Flavonolen und Anthocyanidinen, während in Gegenwart rezessiver Allele nur die entsprechenden 4′-hydroxylierten Flavonoide gebildet werden.

#### 2.1.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Zur Charakterisierung der Enzymaktivität wurden Enzympräparationen aus rosa-farbenen Blüten (Inc/Inc eos/eos) verwendet. Dieser Genotyp bot sich für eine separate Untersuchung der Enzymaktivität an, da aufgrund der rezessiven Allele am Locus eos keine Flavonoid 3′-Hydroxylase-Aktivität zu erwarten war (B.1.2.3.). Die Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität, die aufgrund der Wildtypallele von inc vorhanden war (A.1.2.3.), ließ sich durch Aufarbeitung mit K-Pi-Puffer und Dowex ausschließen.
Nach Inkubation des Rohextrakts mit ($^{14}$C) Naringenin und NADPH zeigte das Radiochromatogramm in CAW ein neues, dicht hinter Naringenin liegendes Produkt. Aufgrund seines Laufverhaltens in 2 weiteren Laufmitteln (30% HOAc, Forestal)

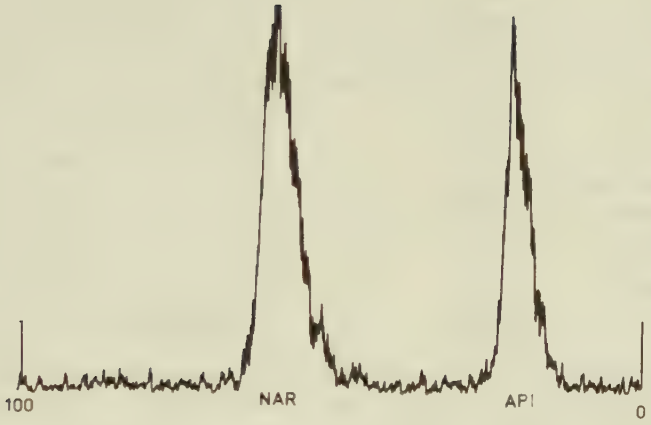



Abb. 8: Radiochromatogramm der enzymatischen Synthese von Apigenin (API) aus Naringenin(NAR) nach Chromatographie in 30% HoAc.

konnte es als Apigenin identifiziert werden. Die Abbildung 8 zeigt die Trennung von Naringenin und Apigenin (API) in 30% HOAc.

Zur subzellulären Lokalisierung des flavonbildenden Enzyms wurden Mikrosomen präpariert und auf Flavanon-Oxidase-Aktivität getestet. Fast die gesamte Enzymaktivität war in der Mikrosomenfraktion enthalten und somit membrangebunden, während der Überstand des mikrosomalen Sediments nur noch Restaktivität zeigte (Tab. XIII).

Die Enzymreaktion war NADPH-abhängig. NADH (0,5 mM) statt NADPH reduzierte die Ausbeute an API auf ca 14% (Tab. XIII).

$Fe^{2+}$, das als Kofaktor für die Reaktion des Enzyms aus jungen Blättern von Petersilie erforderlich war (Sutter et al., 1975), reduzierte hier die Enzymaktivität ein wenig (Tab.XIV).

Tab. XIII: Subzelluläre Lokalisierung und Kofaktor-Abhängigkeit der Flavanon-Oxidase-Aktivität.

| Enzymquelle | Kofaktor | cpm in Apigenin[a] |
|---|---|---|
| Rohextrakt | - | 0 |
| | NADPH | 5 992 |
| Überstand des mikrosomalen Sediments | NADPH | 521 |
| Mikrosomenfraktion | - | 0 |
| | NADPH | 15 569 |
| | NADH | 2 242 |

[a]bezogen auf 50 µg Protein

Eine deutliche Inhibition der Enzymreaktion konnte mit KCN, DPC und pCMB beobachtet werden, während EDTA, DDC und o-Phenanthrolin die Reaktion nicht oder nur minimal reduzierten (Tab. XIV).

Die Enzymreaktion war im Mittel bis 20 µg Protein pro Standardtest linear.
Eine lineare Abhängigkeit der Enzymreaktion von der Inkubationszeit konnte nur bis 5 oder max. 10 min beobachtet werden. Wurden die Mikrosomen 10 min bei 30°C vorinkubiert , und danach die Reaktion durch Zugabe von NADPH gestartet, erhielt man nur ca 50% des normalen Umsatzes zu API.

Das pH-Optimum der Flavanon-Oxidase-Aktivität lag in K-Pi um pH 7.0 (Abb. 9).

Im Zusammenhang mit der Frage nach der Substratspezifität der Flavanon-Oxidase wurde als Substrat im Enzymtest neben NAR das 3',4'-hydroxylierte Flavanon ERI eingesetzt. Das Radiochromatogramm dieser Ansätze zeigte ein neues radioaktives Produkt, das durch Rechromatographie in 3 weiteren Laufmitteln (BAW, Forestal, TBA) als das 3',4'-hydroxylierte

Tab. XIV: Der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Flavanon-Oxidase-Aktivität.

| Substanzen | Flavanon-Oxidase Aktivität (%) |
|---|---|
| keine | 100 |
| EDTA (2 mM) | 100 |
| KCN (5 mM) | 68 |
| DPC (0.5 mM) | 53 |
| pCMB (0.1 mM) | 76 |
| DDC (2 mM) | 89 |
| o-Phenanthrolin (0.1 mM) | 86 |
| $Fe^{2+}$ (1 mM) | 89 |

Flavon Luteolin (LUT) identifiziert werden konnte. Die Umsatzrate von ERI zu LUT entsprach ungefähr 40% des Umsatzes von NAR zu API.
DHK war als Substrat ungeeignet.
Die Abb. 10 zeigt die Substrate und Produkte der von der Flavanon-Oxidase katalysierten Reaktionen.

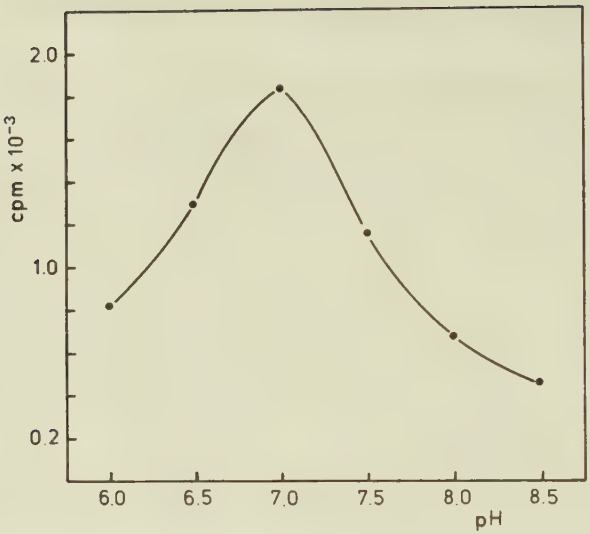



Abb. 9: pH-Abhängigkeit der Flavanon-Oxidase-Aktivität.

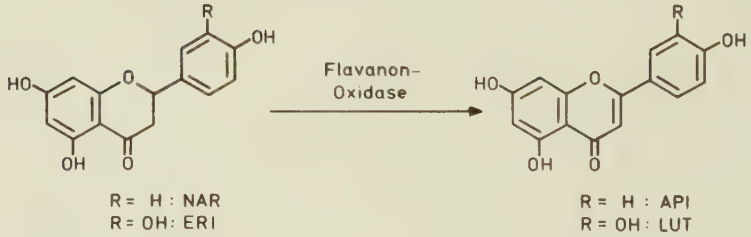



Abb. 10: Enzymatische Umwandlung von Flavanonen zu Flavonen.

## 2.2. Flavanon-Oxidase in anderen Pflanzen

Die Flavanon-Oxidase konnte nicht nur in Blütenextrakten von A. majus, sondern auch in Blütenextrakten von Taraxacum officinale, Zinnia elegans und Verbena hybrida nachgewiesen werden. Dagegen verliefen Untersuchungen an Streptocarpus hybridus und Bellis perennis bisher nicht erfolgreich, obwohl von diesen Pflanzengattungen bekannt ist, daß sie Flavone enthalten.

Die enzymatische Synthese von Apigenin in Blütenextrakten von Zinnia elegans (lachsrosa) konnte unter den gleichen Aufarbeitungs- und Testbedingungen wie in A. majus beobachtet werden.

Die Mikrosomenfraktion aus Taraxacum officinale enthielt Flavanon-Oxidase- und Flavonoid-3'-Hydroxylase-Aktivität, die zur Synthese von Apigenin und Luteolin führten.

Die Eigenschaften der Flavanon-Oxidase aus Verbena hybrida entsprachen ebenfalls denen von A. majus: Die Aktivität war in den Mikrosomen lokalisiert und von NADPH abhängig. NADH reduzierte die Flavonbildung.
In die Untersuchungen wurden 2 Typen einbezogen, 'Blaze' (scharlachrot) und 'Amethyst'(blau). 'Blaze'enthält v.a. Pelargonidin und andere 4'-hydroxylierte Flavonoide, während in 'Amethyst'v.a. Delphinidin und andere 3',4',5'-hydroxylierte Flavonoide vorliegen.
In Übereinstimmung mit diesen Hydroxylierungsmustern synthetisierte der 'Blaze'-Typ im Enzymtest nur Apigenin, während mit Mikrosomen aus dem 'Amethyst'-Typ Apigenin, Luteolin und möglicherweise das 3',4',5'-hydroxylierte Flavon Tricetin gebildet wurden. Da zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Versuche Tricetin als Vergleichssubstanz noch nicht zur Verfügung stand, konnte dieses dritte Produkt nicht mit Sicherheit identifiziert werden. Allerdings bestätigte das chromatographische Verhalten des später aus Lathyrus pratensis isolierten Tricetins die Vermutung, daß es sich um Tricetin handelt.

## B. Oxidations-Reaktionen am B-Ring

Im Gegensatz zu den Oxidationsreaktionen am Heterozyklus, die zu unterschiedlichen Flavonoid-Klassen führen, stellen die Hydroxylierungsreaktionen am B-Ring Modifikationen innerhalb der Flavonoid-Klassen dar.

Aufgrund des Einbaus einer Zimtsäure mit mindestens einer Hydroxylgruppe in para-Position in das Flavonoid-Grundgerüst ist der B-Ring der Flavonoide in der Regel in 4′-Position hydroxyliert. Bevorzugte Positionen für weitere Hydroxylierungen sind die 3′- und die 5′-Position des B-Rings. Um Aufschluß über die Biosynthese dieser in der Natur weit verbreiteten Hydroxylierungsmuster zu gewinnen, sind enzymatische Untersuchungen von großer Bedeutung.

### 1. Flavonoid-3′-Hydroxylase

Forkmann et al. (1980) gelang der erste Nachweis der Flavonoid-3′-Hydroxylase in Blüten.
Die Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität aus Cyanidin-führenden Genotypen von Matthiola incana katalysierte die 3′-Hydroxylierung sowohl von Naringenin (NAR) zu Eriodictyol als auch von Dihydrokämpferol (DHK) zu Dihydroquercetin (DHQ) (Abb. 11). p-Cumarsäure und p-Cumaroyl-CoA dienten hingegen nicht als Substrat. Die Enzymaktivität war membrangebunden und von NADPH abhängig. Das pH-Optimum für die Hydro-

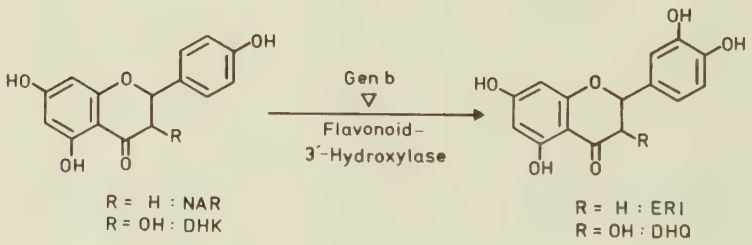



Abb. 11: Wirkung der Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Matthiola incana.

xylierungsreaktion mit NAR als Substrat lag in K-Pi-Puffer bei ungefähr pH 7.2. Während EDTA die Enzymreaktion nur wenig reduzierte, erwiesen sich KCN und DPC als starke Inhibitoren.

Das Gen b bei Matthiola incana kontrolliert die Oxidation der 3′-Position am B-Ring. In Gegenwart rezessiver Allele (bb) werden Pelargonidin-Derivate gebildet, während Wildtypallele ($b^+b^+$) zur Ausprägung von Cyanidin-Derivaten führen.

In allen untersuchten Linien mit dominanten Allelen am Locus b war Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität nachweisbar. In Genotypen mit den rezessiven Allelen hingegen konnte keine Enzymaktivität beobachtet werden.

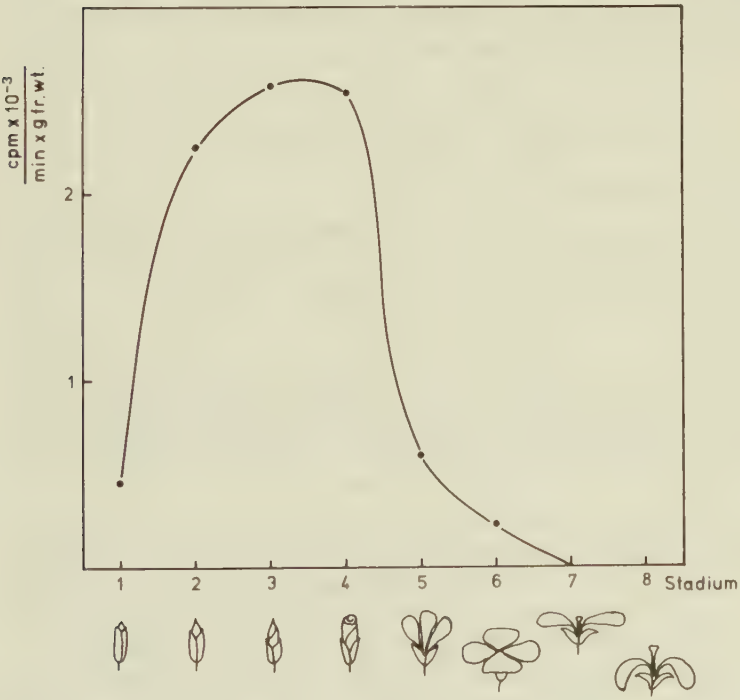



Abb. 12: Aktivitätsverlauf der Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Matthiola incana.

### 1.1. Ergänzende Untersuchung zur Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Matthiola incana.

Da die 3′-Hydroxylase-Aktivität bereits weitgehend charakterisiert war, beschränkten sich die Untersuchungen auf den Aktivitätsverlauf der 3′-Hydroxylase über die Blütenentwicklung.
Als Enzymquelle dienten Mikrosomenpräparationen aus 8 morphologisch unterscheidbaren Blütenstadien eines $b^+$ -Genotyps (Linie 04). In die Quantifizierung der spezifischen Aktivität wurde das Frischgewicht einbezogen (siehe A.1.1.3.).
Der Verlauf der Enzymaktivität beschreibt eine ausgeprägte Optimumkurve (Abb. 12):
Geringe Enzymaktivität ist bereits in den kleinsten Knospen vorhanden, und schon zwischen Stadium 3 und 4 ist das Aktivitäts-Optimum erreicht. Danach fällt die Enzymaktivität sehr stark ab, so daß in Stadium 7 und 8 schließlich keine Aktivität mehr nachweisbar ist.

### 1.2. Flavonoid-3′-Hydroxylase aus A. majus

#### 1.2.1. Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen wurden an den bereits bekannten Genotypen (Tab. V) durchgeführt.
Die Gene niv, sulf und inc wurden schon unter A.1.2.1. beschrieben.

Das Gen eos ist für die vorliegenden Untersuchungen von besonderem Interesse, da es die Hydroxylierung des B-Rings in 3′-Position betrifft (Geissman et al., 1954). Wildtypen (Eos/Eos) enthalten Cyanidin-Derivate, rezessive Genotypen (eos/eos) Pelargonidin-Derivate.
Die Analyse der Zwischenprodukte (Flavanone und Dihydroflavonole) ergab, daß in anthocyanhaltigen Genotypen mit den rezessiven Allelen (eos/eos) nur NAR und DHK vorhanden sind, während farbige, dominante Genotypen (Eos/Eos) zusätzlich ERI und DHK enthalten (Tab. V). Die "incolorata"-Mutante (inc/inc Eos/Eos), die auf der Ebene der Flavanone blockiert ist, reichert NAR und ERI an (Tab. V).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die 3'-OH-Gruppe auf Flavonoid- insbesondere auf Flavanon-Ebene eingeführt wird. Fütterungsexperimente von Harrison und Stickland (1974) ließen den gleichen Schluß zu.

Damit bot auch A. majus günstige Voraussetzungen für den Nachweis einer genkontrollierten 3'-Hydroxylase.

1.2.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Erste Untersuchungen zur enzymatischen 3'-Hydroxylierung wurden in Blüten der"incolorata"-Mutante (inc/inc Eos/Eos) durchgeführt. Dieser Genotyp bot sich für die Untersuchungen an, da aufgrund rezessiver Allele am Locus inc die Flavanon-3-Hydroxylase selektiv eliminiert war (A.1.2.3.).

Nach Inkubation des Rohextrakts mit ($^{14}$C) NAR und NADPH zeigte das Radiochromatogramm in CAW 3 radioaktive Produkte. Die Substanzen mit Rf 76 und 43 wurden als API und LUT identifiziert. Das dritte Produkt (Rf 60) erwies sich als ERI. Seine Identität wurde durch Cochromatographie mit authentischem ERI in 15% HOAc, BAW und TBA belegt (Rf-Werte siehe Tab. II). Dieses Ergebnis konnte ferner durch die enzymatische Umwandlung dieser Substanz zu DHQ (A.1.2.2.) und zu LUT (A.2.1.2.) bestätigt werden.
Sowohl die ERI-Synthese als auch die Synthese der Flavone ließ sich erheblich steigern, wenn eine Mikrosomenpräparation als Enzymquelle eingesetzt wurde.
Ein Vergleich der 3'-Hydroxylierungsaktivität im Überstand und im mikrosomalen Sediment zeigte klar, daß die 3'-Hydroxylase-Aktivität membrangebunden ist (Tab. XV ). Je nach Präparation der Mikrosomenfraktion enthielt der Überstand geringe bzw. keine Aktivität.
Die Enzymreaktion war streng NADPH-abhängig. Ohne diesen Kofaktor wurde das Substrat nicht umgesetzt. NADH (0,5 mM) statt NADPH reduzierte den Umsatz erheblich (Tab. XV).

Da aufgrund der Supplementationsexperimente von Stickland und Harrison (1974) die Einführung der 3'-OH-Gruppe noch auf Dihydroflavonol-Ebene möglich sein sollte, wurde neben NAR auch DHK als Substrat für die Enzymreaktion eingesetzt.

Tab. XV: Subzelluläre Lokalisierung und Kofaktor-Abhängigkeit der 3′-Hydroxylase.

| Enzymquelle | Kofaktor | 3′-Hydroxylierung cpm in ERI[a] | |
|---|---|---|---|
| | | $Mg^{2+}$-Präzipitation | Ultrazentrifugation |
| Rohextrakt | - | 0 | 0 |
| | NADPH | 2 238 | 622 |
| Überstand des mikrosomalen Sediments | - | 0 | 0 |
| | NADPH | 1 543 | 0 |
| Mikrosomales Sediment | - | 0 | 0 |
| | NADPH | 6 339 | 5 275 |
| | NADH | 1 192 | - |

[a] Synthese mit 50 µg Protein

Dabei konnte jedoch keine eindeutige 3′-Hydroxylierung beobachtet werden.

In der Mikrosomenfraktion war neben der 3′-Hydroxylase-Aktivität immer auch Flavanon-Oxidase-Aktivität nachweisbar. Es gab keine genetische oder biochemische Möglichkeit, die Flavanon-Oxidase-Reaktion zu eliminieren. Da beide Enzyme den gleichen Kofaktor benötigen und um das gleiche Substrat (NAR) konkurrieren, und außerdem das Produkt der 3′-Hydroxylase-Aktivität weiter zu LUT umgesetzt wird, konnte die 3′-Hydroxylase-Aktivität bzgl. pH-Optimum, Protein- und Zeitabhängigkeit und Einfluß von Inhibitoren nicht näher charakterisiert werden.

### 1.2.3. Genetische Kontrolle

Der Nachweis der 3′-Hydroxylase-Aktivität wurde in allen untersuchten Genotypen mit dominanten Allelen am Locus eos mit Erfolg geführt. In allen rezessiven Genotypen konnte im Gegensatz dazu keine 3′-Hydroxylase-Aktivität nachgewiesen werden. Mischexperimente mit Mikrosomen aus dominanten

und rezessiven Genotypen wiesen darauf hin, daß die in rezessiven Genotypen fehlende Enzymaktivität nicht auf die Existenz eines löslichen Inhibitors zurückzuführen ist.

Während in Standardtests mit Proteinextrakten aus rezessiven Genotypen nur API synthetisiert wurde, traten in Tests mit Proteinextrakten aus dominanten Genotypen zusätzlich die 3',4'-hydroxylierten Produkte ERI und LUT auf. Zur Beantwortung der Frage, auf welchem Wege LUT gebildet wird, ob über API oder über ERI, müssen die Substratspezifitäten der beiden Enzyme 3'-Hydroxylase und Flavanon-Oxidase herangezogen werden.
API konnte nicht, oder nur in geringem Ausmaß in 3'-Position hydroxyliert werden. Es stellt somit im Gegensatz zu NAR kein geeignetes Substrat der 3'-Hydroxylase dar. Die Flavanon-Oxidase dagegen katalysierte unabhängig von der genetischen Situation am Locus eos die Umwandlung von ERI zu LUT. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß LUT über ERI synthetisiert wird (Abb. 13).

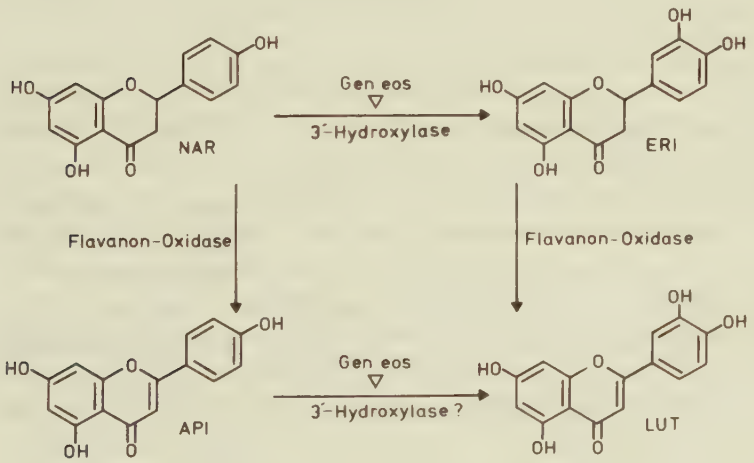



Abb. 13: Der biogenetische Zusammenhang zwischen Flavanonen (NAR, ERI) und Flavonen (API, LUT).

## 1.3. Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Petunia hybrida

### 1.3.1. Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen umfaßten 7 genetisch definierte Linien (Tab. XVI).

Tab. XVI: Chemogenetische Charakterisierung der untersuchten Genotypen und die genetische Kontrolle der Flavonoid-3′-Hydroxylase.

| Linie | Genotyp (homozygot) | Endprodukte (Aglyka) | Flavonoid-3′-Hydroxylase |
|---|---|---|---|
| W 37 | an3 htl hfl | NAR | - |
| W 39 | an3 Htl hfl | NAR, ERI | + |
| R 27 | An3 Htl hfl | Cy (Dp) | + |
| R 3 | An3 Htl hfl | Cy (Dp) | + |
| R 4 | An3 htl hfl | Km (Dp) | - |
| W 42 | anl Htl hfl | Qu | + |
| W 24 | anl htl Hfl | DHK | - |

( ) = geringe Mengen

Der Hydroxylierungsgrad des B-Rings wird in Petunia hybrida durch die Hydroxylierungsgene Htl bzw. Ht2 und Hfl bzw. Hf2 bestimmt (Wiering, 1974).

Das Gen Htl bzw. Ht2 ist für die Hydroxylierung des B-Rings in 3′-Position verantwortlich. Dominante Allele am Locus Ht führen zur Synthese von Cyanidin und Quercetin. In Gegenwart rezessiver Allele und unter der Voraussetzung, daß auch am Locus Hf rezessive Allele vorliegen, wird nicht Pelargonidin gebildet, sondern es werden Kämpferolglykoside angereichert. Die Gene Htl und Ht2 unterscheiden sich im Wirkungsort in der aufgeblühten Blüte. Htl wird phänotypisch sowohl im äußeren Teil der Blüte als auch in der Blütenröhre ausgeprägt, während die Wirkung von Ht2 auf die Röhre beschränkt ist und

auch nur dann ausgeprägt wird, wenn rezessive Allele des Gens Htl vorliegen. Das Gen Ht2 blieb bei den enzymatischen Untersuchungen unberücksichtigt, da nur die äußeren Teile der Blüte für die Enzympräparationen verwendet wurden.

Die Gene Hf1 und Hf2 kontrollieren die 3',5'-Hydroxylierung und sollen deshalb an späterer Stelle beschrieben werden.

Neben dem Anthocyangen An3, das schon beschrieben wurde (A.1.3.1.), ist das Gen An1 für die vorliegenden Untersuchungen besonders interessant.
Die rezessive Mutation am An1-Locus blockiert den Biosyntheseschritt von den Dihydroflavonolen zu den Anthocyanen. Daneben beeinflußt sie offensichtlich auch die Expression des Gens Hf1. Die Expression des Gens Ht1 wird durch An1 hingegen nicht beeinträchtigt (Gerats et al., 1982). Die An1-Mutanten erwiesen sich somit für die Untersuchungen zur 3'-Hydroxylase als außerordentlich wertvoll, da sie die Möglichkeit bieten, die Wirkung von Ht1 unabhängig von Hf1 zu erfassen.

Chemogenetische Untersuchungen an weißen Mutanten, die entweder Zimtsäuren, Flavanone oder Dihydroflavonole akkumulieren, zeigten, daß das Gen Ht auf das Hydroxylierungsmuster der Zimtsäuren keinen Einfluß hat, während hingegen das Hydroxylierungsmuster der Flavanone und Dihydroflavonole von der Allelsituation am Locus Ht abhängig ist (Doodeman et al., 1982).
Fütterungsexperimente an An3-Mutanten sprachen insbesondere für die Wirkung des Gens auf Dihydroflavonol-Ebene. Nach Fütterung mit DHK synthetisierte die Ht1-dominante Linie W 39 neben wenig Delphinidin und Petunidin vor allem Cyanidin (Tabak et al., 1981).

Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß das Gen Ht1 eine Hydroxylase kontrolliert, die spezifisch Flavonoide in 3'-Position hydroxyliert.

### 1.3.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

In Vorversuchen wurden Rohextrakte und Mikrosomenfraktionen aus aufgeblühten Blüten der Linie R 3 auf 3′-Hydroxylase-Aktivität getestet. Während in einigen Versuchen ein geringer Umsatz von NAR zu ERI beobachtet werden konnte, war in anderen keine 3′-Hydroxylase-Aktivität nachweisbar.
Da einer der Gründe für die fehlende bzw. geringe Enzymaktivität im aufgearbeiteten Blütenstadium liegen könnte, wurde zunächst der Verlauf der Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit von der Blütenentwicklung verfolgt.
Folgende Knospen- und Blütenstadien wurden untersucht:

1 : schmale Knospen, leicht gefärbt, ca 3.0-3.5 cm lang
2 : breitere Knospen, stärker gefärbt, ca 4 cm lang
3 : Knospenspitzen leicht geöffnet, Knospen ca 4.5 cm lang
4 : Blüten geöffnet, Petalen stehen im $90^{o}$Winkel zueinander
5 : Blüten weit geöffnet, ca $180^{o}$
6 : welkende Blüten

Die Enzymaktivitäten wurden im Rohextrakt gemessen, da von den jungen Blütenstadien keine ausreichenden Mengen zur Verfügung standen, um Mikrosomen präparieren zu können.

Die Enzymaktivität zeigte über die Blütenentwicklung einen unerwartet drastischen Verlauf (Abb. 14).
Bereits in den kleinsten Knospen war die Enzymaktivität maximal. Danach fiel sie kontinuierlich bis Stadium 6 ab, in dem sie bereits unter der Nachweisgrenze lag (Abb. 14).

Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, wie sich die Enzymaktivitäten in den Mikrosomenfraktionen verhalten, wurden 3 Präparationen miteinander verglichen. Die Mikrosomenfraktion, die aus einer Blütenmischung von Stadium 1 - 3 präpariert worden war, enthielt hohe 3′-Hydroxylase-Aktivität, während in den Mikrosomenfraktionen der Stadien 5 und 6 bereits keine Aktivität mehr nachweisbar war.

Somit konnte die fehlende oder geringe Enzymaktivität in den Vorversuchen eindeutig auf das bisher verwendete Blütenstadium (ca Stadium 5) zurückgeführt werden.

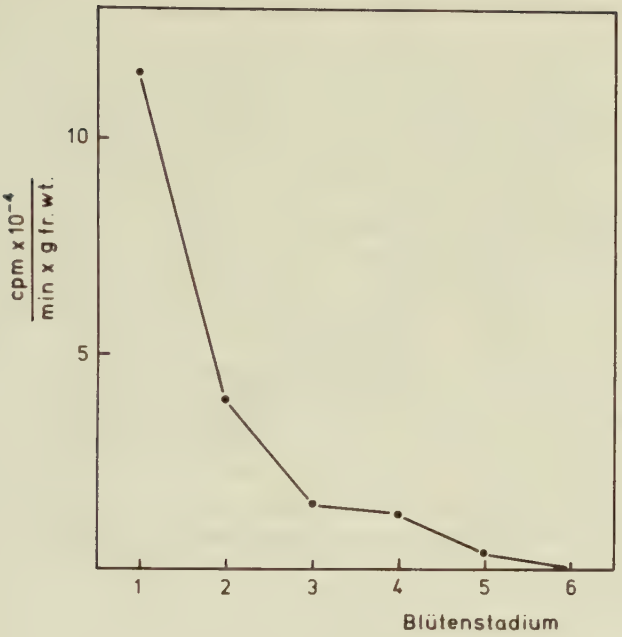



Abb. 14: Die Aktivität der Flavonoid-3′-Hydroxylase im Verlauf der Blütenentwicklung; die Enzymaktivitäten wurden in Rohextrakten der Linie R 3 gemessen.

Da für die Präparation von Mikrosomen mindestens 3 - 4 g Blüten bzw. Knospen benötigt werden, diese Menge aber von einem einzelnen Knospenstadium nicht zur Verfügung stand, wurden für die Charakterisierung der 3′-Hydroxylase-Aktivität Mischungen der Blütenstadien 1 - 3 verwendet.

Nach Inkubation von ($^{14}$C)Naringenin und NADPH mit der Mikrosomenfraktion aus der Linie R 3 zeigte das Radiochromatogramm 4 Produkte (Abb. 15).
Das Hauptprodukt (Rf 58) konnte als Eriodictyol identifiziert werden. Die Substanz mit einem Rf-Wert von 23, die allerdings nur in sehr geringen Mengen gebildet worden war, entsprach überraschenderweise Pentahydroxyflavanon.

Ferner traten 2 Produkte mit den Rf-Werten 75 (X) und 36 (Y) auf, die bisher nicht identifiziert werden konnten. Möglicherweise

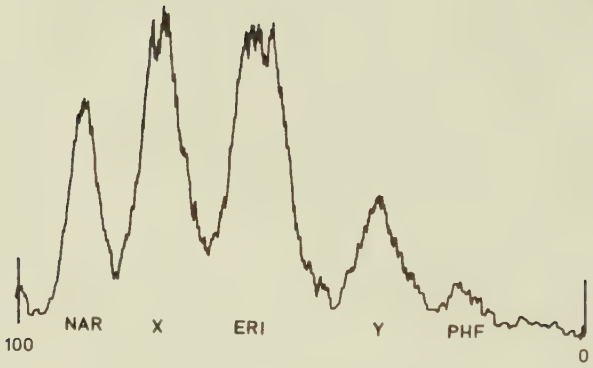



Abb. 15: Radiochromatogramm einer Inkubation von ($^{14}$C)Naringenin und NADPH mit der Mikrosomenfraktion aus Linie R 3.

handelt es sich dabei um Abbauprodukte des Eriodictyols. Aufschluß über die Synthese dieser beiden Produkte gaben Enzymtests, in denen ($^{14}$C)Eriodictyol als Substrat eingesetzt wurde:

In Enzymtests mit NADPH wurden ca 50% des eingesetzten ERI zur Substanz X umgesetzt; die Synthese der Substanz Y lag hingegen an der Nachweisgrenze. Enzymtests ohne NADPH zeigten, daß X und Y auch unabhängig von NADPH synthetisiert werden. KCN (5 mM) und DDC (2 mM) inhibierten die Synthese beider Substanzen nahezu vollständig.

Somit konnte davon ausgegangen werden, daß die Substanz X aus ERI hervorgeht. Deshalb wurde zur Bestimmung der Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität die Radioaktivität der Produkte ERI und X addiert. Da die Synthese der Substanz Y zum einen nicht eindeutig geklärt werden konnte und zum anderen mengenmäßig meist sehr unbedeutend war, blieb die Substanz

Y bei der Quantifizierung der Enzymaktivitäten unberücksichtigt.

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß in Enzymtests mit Mikrosomenfraktionen aus Linie R 27 zwar vergleichbare Mengen an ERI und PHF synthetisiert wurden, daß hier aber nie die Produkte X und Y auftraten.

Die Flavonoid-3′-Hydroxylase konnte nicht nur NAR in 3′-Position hydroxylieren, sondern auch DHK. Verglichen mit der Umsatzrate von NAR zu ERI war allerdings der Umsatz in diesem Fall um ca 50% reduziert.

Zur subzellulären Lokalisierung wurde die 3′-Hydroxylase-Aktivität im Rohextrakt, im mikrosomalen Sediment und in dem dazugehörigen Überstand gemessen.
Die Enzymaktivität war in der Mikrosomenfraktion lokalisiert (Tab. XVII). Sie war außerdem streng NADPH-abhängig. NADH reduzierte die 3′-Hydroxylierung auf 43% (Tab. XVII).

Tab. XVII: Subzelluläre Lokalisierung und Kofaktorabhängigkeit der Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Linie R 3.

| Enzymquelle | Kofaktor | 3′-Hydroxylierung cpm in (ERI + Substanz X)[a] |
|---|---|---|
| Rohextrakt | – | 0 |
| | NADPH | 965 |
| Überstand des mikrosomalen Sediment | NADPH | 366 |
| Mikrosomales Sediment | – | 0 |
| | NADPH | 2 312 |
| | NADH | 994 |

[a] Produktbildung mit 25 µg Protein

Im Standardansatz verlief die Enzymreaktion bis zu einer Proteinmenge von 25 µg linear.
Eine lineare Abhängigkeit zwischen Reaktionszeit und Produktbildung bestand nur während der ersten Minuten der Inkubation.

Ein optimaler Umsatz von NAR zu ERI war in K-Pi-Puffer um pH 7.5 zu erreichen (Abb. 16).

KCN (5 mM) und DDC (2 mM) konnten zwar die Synthese der Substanz X unterbinden, sie hatten aber, ebenso wie EDTA (2 mM) und pCMB (0.1 mM) keinen Einfluß auf die Aktivität der Flavonoid-3′-Hydroxylase. DPC (0.5 mM) zeigte eine geringe inhibitorische Wirkung; der Umsatz von NAR zu ERI war gegenüber der Kontrolle um ca 30% reduziert.

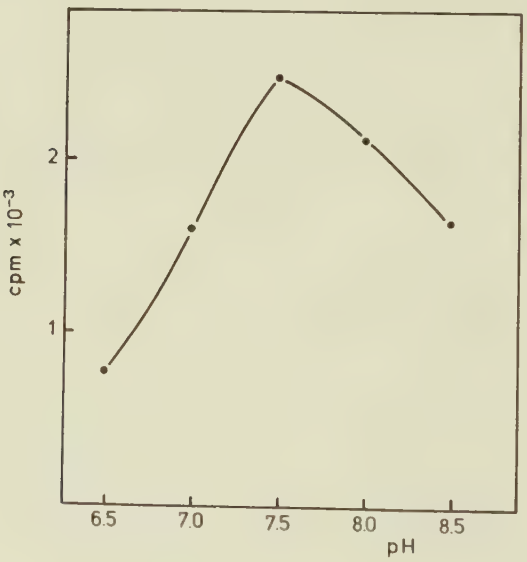



Abb. 16: pH-Abhängigkeit der Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Petunia hybrida.

### 1.3.3. Genetische Kontrolle

Die enzymatische Synthese von ERI gelang mit Proteinextrakten aus allen Htl dominanten Genotypen.
In diesen Enzymtests wurde aber trotz rezessiver hfl-Allele neben ERI immer auch 5,7,3′,4′,5′-Pentahydroxyflavanon (PHF) gebildet (Tab. XVIII, Bsp. R 3). Die synthetisierte Menge an PHF betrug allerdings maximal 1/10 des synthetisierten ERI.

In Enzymtests mit den htl rezessiven Genotypen wurde überraschenderweise neben einer geringen Menge an PHF auch die Synthese von ERI beobachtet (Tab. XVIII, Bsp. R4). Somit blieb zunächst offen, ob das in ht rezessiven Genotypen synthetisierte ERI tatsächlich das Produkt der 3′-Hydroxylase-Aktivität darstellt, oder ob es ausschließlich als Zwischenprodukt der 3′,5′-Hydroxylase-Reaktion zu PHF anzusehen ist.
Zur Klärung dieses Problems wurden die Anl-Mutanten W 42 und W 24 (Tab. XVI) herangezogen. Hier konnte eine eindeutige Korrelation zwischen der Allelsituation am Locus Htl und der 3′-Hydroxylase-Aktivität beobachtet werden: Während im Htl dominanten Genotyp W 42 die Flavonoid-3′-Hydroxylase aktiv war, fehlte sie im rezessiven Genotyp W 24 völlig.

Tab. XVIII: Synthese von ERI und PHF in den Linien R 3 und R 4.

| Enzymquelle | Kofaktor | R 3 (Ht hf) cpm in ERI[a,b] | R 3 (Ht hf) cpm in PHF[a] | R 4 (ht hf) cpm in ERI[a,b] | R 4 (ht hf) cpm in PHF[a] |
|---|---|---|---|---|---|
| Rohextrakt | NADPH | 2 937 | 176 | 282 | 46 |
| Mikrosomenfraktion | NADPH | 5 496 | 169 | 1 122 | 145 |

[a] Synthese bei 25 µg eingesetztem Protein

[b] ERI einschließlich Substanz X

## 1.4. Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Lathyrus odoratus

### 1.4.1. Pflanzenmaterial

Chemo-genetische Arbeiten über die Blütenfarbe von Lathyrus sind schon in den 40-iger Jahren durchgeführt worden (Beale et al., 1939).
Beale et al. beschrieben 2 Gene, die den Hydroxylierungsgrad der Anthocyane bestimmen. Das Gen sm (salmon) ist für die Ausbildung von Cyanidin verantwortlich. sm ist rezessiv und hypostatisch zum Gen e,das zur Ausprägung von Delphinidin führt. Den 3 Blütenfarbtypen blau, rot und lachsfarben konnten Beale et al. infolgedessen folgende genetische Situation zuordnen: blau (Delphinidin-Typ): E Sm oder E sm,
rot (Cyanidin-Typ) : e Sm
lachsfarben (Pelargonidin-Typ): e sm.

Aufgrund dieser chemogenetischen Ergebnisse schien es sinnvoll, Lathyrus odoratus in die Untersuchungen über die 3′-Hydroxylierung einzubeziehen.

Aus dem Handelssortiment wurden 2 Farbtypen ausgewählt: Die karminroten Sorten "Riesentreib Carmen" und "Riesentreib Margarete" enthalten Cyanidin und/oder Päonidin und sollten deshalb dem Genotyp e Sm entsprechen. Die lachsfarbene Sorte "Riesentreib Ramona" enthält nur Pelargonidin; sie sollte den rezessiven Genotyp e sm vertreten.

Während in den Pelargonidin-führenden Blüten keine 3′-Hydroxylase-Aktivität zu erwarten war, sollte in den Cyanidin-haltigen Blüten diese Aktivität nachweisbar sein.

### 1.4.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität war bereits im Rohextrakt aus karminroten Blüten nachweisbar. Sie ließ sich jedoch erheblich steigern (ca 3,5 -fach), wenn eine Mikrosomenpräparation aus diesen Blüten als Enzymquelle eingesetzt wurde. In Inkubationen mit NAR als Substrat wurde ERI als einziges Produkt synthetisiert (Abb. 17).

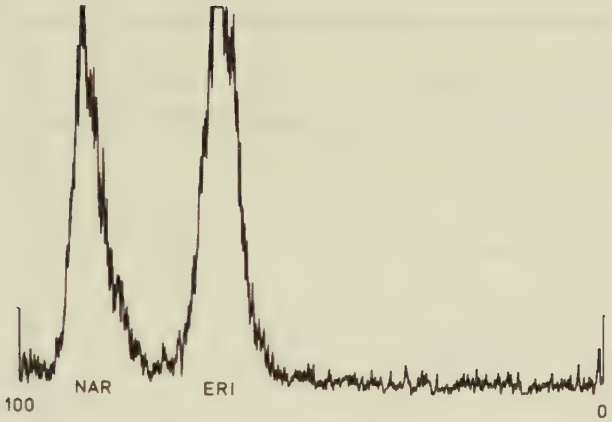



Abb. 17: Radiochromatogramm einer Inkubation von ($^{14}$C) NAR mit NADPH und der Mikrosomenfraktion aus karminroten Blüten (Laufmittel CAW).

Die Enzymreaktion war streng NADPH-abhängig. NADH (0.5 mM) konnte NADPH nicht ersetzen; es reduzierte die Enzymaktivität auf ca 30%.

Die 3′-Hydroxylase-Reaktion war in vitro nicht hemmbar. Als mögliche Inhibitoren wurden EDTA, KCN, DDC, DPC und pCMB getestet.

Die Zugabe von 5 µg bzw. 10 µg unmarkiertem ERI reduzierte die Enzymaktivität auf 21% bzw. 7% gegenüber der Kontrolle. Diesen Befunden liegt möglicherweise eine Endproduktheмmung der Enzymaktivität zugrunde.
Die Enzymaktivität verlief im Standardansatz bis zu einer Inkubationszeit von ca 8 min linear (Abb. 18). Danach war nur noch ein geringer Anstieg der ERI-Bildung zu beobachten.

Die Aktivität der 3′-Hydroxylase zeigte in K-Pi-Puffer ein pH-Optimum um pH 8.0 (Abb. 19).

Nicht nur NAR, sondern auch DHK diente als Substrat der 3′-Hy-

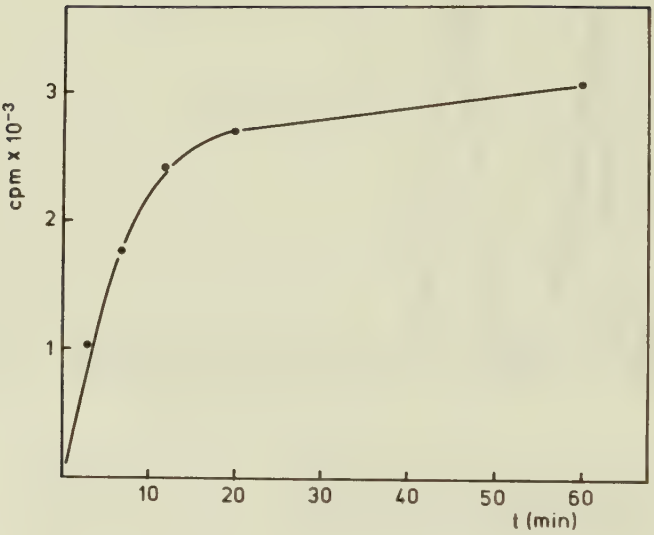



Abb. 18: Abhängigkeit der 3'-Hydroxylase-Aktivität von der Inkubationszeit.

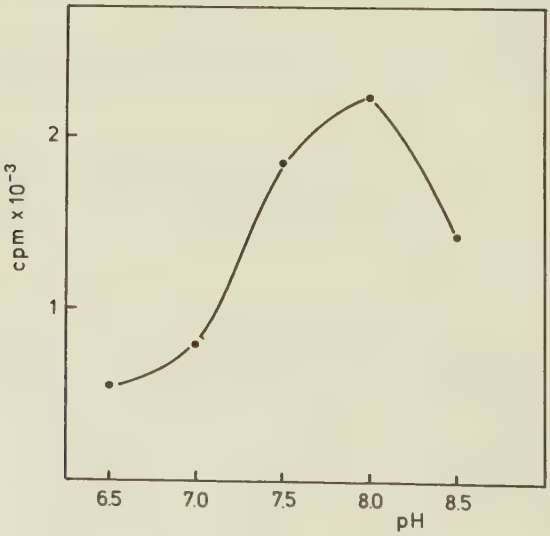



Abb. 19: pH-Abhängigkeit der 3'-Hydroxylase-Aktivität.

droxylase. Während 50 - 60% des eingesetzten NAR zu ERI umgesetzt wurden, betrug der Umsatz von DHK zu DHQ allerdings nur ca. 30%.
Wurde das bereits in 3′-Position hydroxylierte ERI als Substrat eingesetzt, erfolgte keine weitere Hydroxylierung in 5′-Position.

### 1.4.3. 3′-Hydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit des Hydroxylierungsmusters der Flavonoide.

Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität konnte nur in Extrakten aus karminroten Blüten ("Riesentreib Carmen" bzw. "Margarete") nachgewiesen werden. In Extrakten aus lachsfarbenen Blüten wurde hingegen weder im Rohextrakt noch in der Mikrosomenfraktion eine 3′-Hydroxylierung beobachtet.
Um die Möglichkeit auszuschließen, daß ein löslicher Inhibitor für den Ausfall der 3′-Hydroxylase-Aktivität verantwortlich ist, wurden Mischexperimente mit Mikrosomenpräparationen aus Blüten des Pelargonidin- und des Cyanidin-Typs durchgeführt. Es zeigte sich jedoch keine Beeinflussung der 3′-Hydroxylase-Aktivität; die Enzymaktivitäten verhielten sich additiv.

## 1.5. Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Callistephus chinensis

### 1.5.1. Pflanzenmaterial

Aus der Vielzahl der an unserem Institut vorliegenden, definierten Linien wurden die Genotypen 02, 03, 05 ausgewählt (Tab. XIX).

Zur Anthocyansynthese sind Wildtypallele an den komplementär wirkenden Loci ch, a und f erforderlich (Seyffert, 1982). Rezessive Allele am Locus ch führen zur Anreicherung von 4,2′,4′,6′-Tetrahydroxychalkon-2′-Glucosid. Durch enzymatische Untersuchungen konnte das Gen ch mit der Chalkon-Isomerase -Aktivität korreliert werden (Kuhn et al., 1978). In Anwesenheit rezessiver Allele a und/oder f reichern die Blüten Flavone und Flavonole an.

Tab. XIX: Chemogenetische Charakterisierung der untersuchten Genotypen.

| Linie | Genotyp (homozygot) | Blüten-farbe | Anthocyane |
|---|---|---|---|
| 02 | Ch A F r´M | lila | Cy (+ Pg, + Dp) -3,5-Diglucosi |
| 03 | Ch A F r M | rosa | Pg (+ Cy) -3,5-Diglucosid |
| 05 | Ch A F r´m | purpur | Cy (+ Pg, + Dp) -3 Monoglucosi |

Das Gen M bestimmt das Glykosidierungsmuster der Anthocyane (Wit, 1937; Forkmann, 1977). 3,5-diglucosidierte Anthocyane werden in Anwesenheit dominanter Allele synthetisiert, während bei rezessiven Allelen 3-Glucoside vorliegen.

Für die Hydroxylierung des B-Rings ist der Locus r mit den multiplen Allelen R/r´/r verantwortlich (Wit, 1937; Forkmann, 1977). Sie entscheiden, welches Anthocyanidin bevorzugt gebildet wird. So enthalten Blüten des Typs rr neben Cyanidin überwiegend Pelargonidin, Blüten des Typs r´r´vor allem Cyanidin neben wenig Pelargonidin und Delphinidin und Blüten des Typs RR neben wenig Cyanidin und Spuren von Pelargonidin überwiegend Delphinidin (Forkmann, 1977).

Für enzymatische Untersuchungen zur Hydroxylierung des B-Rings war Callistephus chinensis somit ein interessantes Objekt.

Aufgrund ungünstiger Witterungsbedingungen und starkem Krankheitsbefall in 2 aufeinanderfolgenden Jahren standen innerhalb einer kurzen Blühperiode allerdings nur sehr wenige Pflanzen für die Untersuchungen zur Verfügung.

1.5.2. Nachweis des Enzyms

"Pelargonidin-Typ" rr:

Während in Enzymtests mit Rohextrakten aus Blüten der Linie 03 (rr) keine 3´-Hydroxylase-Aktivität nachweisbar war, wurde

in Enzymtests mit Mikrosomenfraktionen derselben Linie eine geringe Menge an NAR zu API und ERI umgewandelt. Die Synthese beider Produkte war von NADPH abhängig. Das heißt, die Linie 03 mit den Allelen rr besitzt eine geringe 3′-Hydroxylase-Aktivität.

"Cyanidin-Typ" r′r′:

Für die Untersuchungen wurden Blüten der Linie 02 oder 05 verwendet.
In Inkubationen von Rohextrakten mit ($^{14}$C)NAR und NADPH war kein Umsatz zu ERI meßbar.
In Tests mit Mikrosomenfraktionen hingegen konnte eine geringe Synthese von API und ERI beobachtet werden. Ohne NADPH oder mit NADH als Kofaktor wurde keines der Produkte synthetisiert.
Die Flavonoid-3′-Hydroxylase konnte somit zwar in den Cyanidin-Typen (r′r′) nachgewiesen werden, allerdings nur mit einer ähnlich geringen Aktivität wie im Pelargonidin-Typ 03. Da die Linien 02 und 05 aber im Gegensatz zur Linie 03 überwiegend Cyanidin enthalten, war eine deutlich höhere Aktivität der 3′-Hydroxylase erwartet worden.

Da die geringen Enzymaktivitäten auf ungeeigneten Aufarbeitungsbedingungen beruhen könnten, wurde die Enzympräparation (I.2.3.) auf folgende Weise verändert:

- Verwendung von Tris/HCl Puffer pH 7.5
- Zusatz von 0.1 % Triton x 100 in den Aufarbeitungspuffer (K-Pi)
- PVP als phenolbindende Substanz
- Homogenisation mit dem Ultra-Turrax
- Aufschluß mit flüssigem $N_2$
- Gelfiltration des Rohextrakts über Sephadex G-50 fine

Keine der veränderten Aufarbeitungsbedingungen konnte jedoch die Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität stimulieren.

Deshalb wurden die Bedingungen im Enzymtest variiert:

- veränderte pH-Bedingungen:
  Weder bei pH 6.5 noch bei pH 8.0 wurde eine höhere Ausbeute an ERI erzielt.

- ($^{14}C$) DHK als Substrat:
  Mit DHK konnte keine 3′-Hydroxylase-Aktivität beobachtet werden.
- Enzymextrakte aus verschiedenen Blütenstadien:
  Neben den üblicherweise verwendeten Extrakten aus dem mittleren Blütenstadium wurden Proteinextrakte sowohl aus sehr jungen als auch aus bereits welkenden Blüten auf 3′-Hydroxylase-Aktivität getestet. Die Enzymaktivität konnte in beiden Fällen nicht stimuliert werden.

Der Befund der äußerst geringen 3′-Hydroxylase-Aktivität im Cyanidin-Typ ist somit wahrscheinlich nicht auf unzureichende Aufarbeitungs- oder Testbedingungen zurückzuführen.

## 2. Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase

Im Gegensatz zur Frage der 3′-Hydroxylierung, die schon zu Beginn dieser Arbeit von mehreren Seiten beleuchtet worden war, lagen zum Problem der Hydroxylierung in 3′- und 5′-Position nur einige wenige, überwiegend genetische Daten vor.

### 2.1. Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase aus Verbena hybrida

#### 2.1.1. Pflanzenmaterial

Genetische und chemogenetische Daten von Verbena hybrida gehen auf Beale zurück (Beale, 1940; Beale et al., 1940). Er beschreibt einen Locus P, der das Hydroxylierungsmuster der Anthocyane kontrolliert. Dieser Locus ist durch 3 Allele $P^d$, P und p vertreten. Pelargonidin ist an die Anwesenheit der Allele $P^d$ oder p gekoppelt, während Delphinidin nur gebildet wird, wenn das Allel P vorliegt.
Bemerkenswert an dieser Allelie ist, daß die beiden Extreme $P^d$ und p phänotypisch identisch sind und sich nur im Dominanzverhältnis zum Allel P unterscheiden. Das bedeutet, daß Delphinidin(P) nicht nur dominant über Pelargonidin(p) ist - wie in den meisten Pflanzen der Fall - sondern auch rezessiv zu Pelargonidin($P^d$). In Ausnahmefällen liegt auch eine inkomplette Dominanz vor.
Beale berichtet außerdem über das Vorkommen von Cyanidin neben den Hauptpigmenten Pelargonidin und/ oder Delphinidin.

Da keine genetisch definierten Linien zur Verfügung standen, wurden die von Beale beschriebenen Farbtypen aus dem Handelssortiment ausgewählt (Tab. XX).

Die blauen Typen enthielten hauptsächlich Delphinidin und andere 3′,4′,5′-hydroxylierten Flavonoide, während in den roten bzw. rosa-gefärbten Blüten überwiegend Pelargonidin nachgewiesen werden konnte (Forkmann, unveröffentlicht). In allen untersuchten Pflanzen fanden sich zusätzlich geringe Mengen an 3′,4′-hydroxylierten Flavonoiden einschließlich Cyanidin.

Tab. XX: Chemische und enzymatische Charakterisierung der untersuchten Sorten von Verbena hybrida.

| Sorte | Blüten-farbe | Anthocyanidine | Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase |
|---|---|---|---|
| Amethyst | blau | Dp (Cy) | + |
| Sternenlicht | purpur | Dp (Cy) | + |
| Azurella | blau | Dp (Cy) | + |
| Blaze | rot | Pg (Cy) | - |
| Flammenspiel | rosa | Pg (Cy) | - |

2.1.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Bei in vitro Untersuchungen über die Flavanon-Oxidase-Aktivität in Proteinextrakten aus blauen Blüten (Amethyst) wurde eine überraschende Beobachtung gemacht.
Das Substrat ($^{14}$C)Naringenin war nicht nur zu den Flavonen API, LUT und möglicherweise Tricetin (TRI) umgesetzt worden, sondern auch zu 2 weiteren Produkten (Abb. 20).
Ein Produkt (Rf 58) konnte durch Rechromatographie in 3 weiteren Laufmitteln (30% HoAc, Forestal, BAW) und durch seine enzymatische Umsetzung zu DHQ mit einem Rohextrakt aus Matthiola incana als ERI identifiziert werden. Das chromatographische Verhalten des zweiten Produkts (Rf 25) ließ vermuten, daß es sich um das 3′,4′,5′-hydroxylierte Flavanon handelt.

Dieses Flavanon, das bisher in der Literatur noch nie beschrieben worden ist, konnte kürzlich in Helichrysum bracteatum nachgewiesen und daraus isoliert werden (Forkmann, 1983). Durch Cochromatographie mit dieser Substanz bestätigte sich die Vermutung, daß es sich bei dem im Enzymtest gebildeten Produkt um 5,7,3′,4′,5′-Pentahydroxyflavanon (PHF) handelt. Seine Identität wurde ferner durch die enzymatische Umsetzung mit Proteinextrakten aus Matthiola incana zu Dihydromyricetin (DHM) belegt.

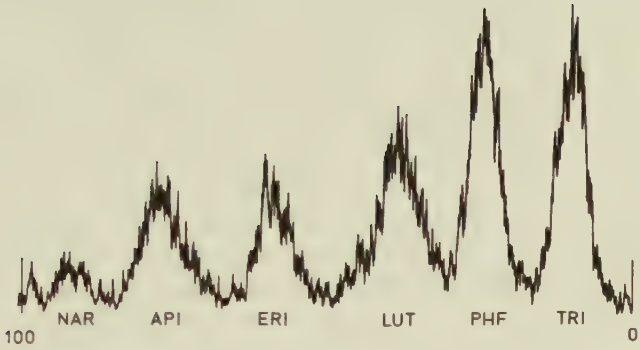



Abb. 20: Radiochromatogramm einer Inkubation von ($^{14}$C) NAR und NADPH mit der Mikrosomenfraktion aus blauen Blüten von Verbena hybrida (Laufmittel CAW).

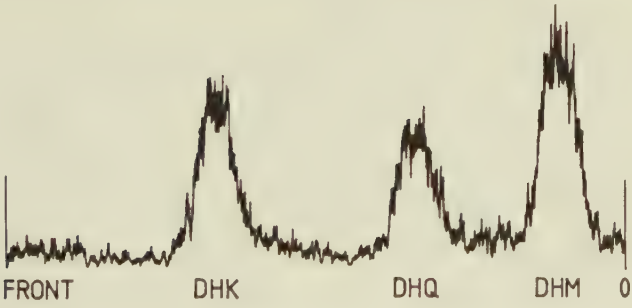



Abb. 21: Radiochromatogramm einer Inkubation von ($^{14}$C)DHK und NADPH mit der Mikrosomenfraktion aus blauen Blüten. (Laufmittel CAW).

Neben NAR diente auch DHK als Substrat. Die synthetisierten Produkte waren in diesem Fall DHQ und DHM (Abb. 21). Ihre Identifizierung erfolgte durch Rechromatographie mit den authentischen Dihydroflavonolen in 2 weiteren Laufmitteln (30% HOAc und Forestal) und durch Oxidation mit Na-Metabisulfit zu den entsprechenden Flavonolen (Kho et al., 1975).

Neben der Synthese des 3′,4′,5′-hydroxylierten Produkts PHF bzw. DHM wurde in allen Tests die Synthese des entsprechenden 3′,4′-hydroxylierten Flavonoids ERI bzw. DHQ beobachtet. Da trotz verschiedenster Reaktionsbedingungen die alleinige Hydroxylierung in 3′-Position nicht unterdrückt werden konnte, wurde vermutet, daß die Synthese des 3′,4′,5′-hydroxylierten Produkts über das entsprechende 3′,4′-hydroxylierte läuft. Diese Vermutung wurde durch den Befund erhärtet, daß ERI bzw. DHQ als Substrat für die 5′-Hydroxylierung zu PHF bzw. DHM diente.

Zur Frage nach der subzellulären Lokalisierung der 3′,5′-Hydroxylase-Aktivität wurden die Enzymaktivitäten im Rohextrakt und in der Mikrosomenfraktion miteinander verglichen (Tab. XXI).

Tab. XXI: Subzelluläre Lokalisierung und Kofaktorabhängigkeit der 3′,5′-Hydroxylierungsaktivität in blauen Blüten von Verbena hybrida.

| Enzymquelle | Kofaktor | Substrat: ($^{14}$C)NAR cpm in PHF[a] | Substrat: ($^{14}$C) DHK cpm in DHM[a] |
|---|---|---|---|
| Rohextrakt | - | 0 | 0 |
| | NADPH | 570 | 816 |
| Überstand des mikrosomalen Sediments | - | 0 | 0 |
| | NADPH | 70[b] | 728[c] |
| Mikrosomales Sediment | - | 0 | 0 |
| | NADPH | 2 738[b] | 2 712[c] |
| | NADH | 169[b] | 281[c] |

[a]Produktbildung mit 50 µg Protein

[b]Mikrosomenpräparation durch Ultrazentrifugation

[c]Mikrosomenpräparation durch $Mg^{2+}$-Präzipitation

Die 3',5'-Hydroxylase-Aktivität erwies sich eindeutig als membrangebunden und NADPH-abhängig (Tab. XXI). NADH reduzierte die Ausbeute an PHF bzw. DHM um ca 90%.

Die weitere Charakterisierung der 3',5'-Hydroxylase-Aktivität wurde ausschließlich mit ($^{14}$C) DHK als Substrat durchgeführt. DHK bot gegenüber NAR den Vorteil, die 3',5'-Hydroxylase-Aktivität separat untersuchen zu können, da es von der Flavanon-Oxidase nicht als Substrat verwendet werden kann. Die 3',5'-Hydroxylase-Aktivität gemessen an synthetisiertem DHM verlief bis ca 40 µg Protein pro Testansatz linear.

Eine lineare Abhängigkeit der Produktbildung (DHM) von der Zeit bestand nur bis maximal 10 min (Abb. 22).
Das pH-Optimum der 3',5'-Hydroxylierungsreaktion zu DHM lag bei pH 7.5 (Abb. 23).

Der Einfluß von KCN (5 mM), EDTA (2 mM), DPC (0.5 mM), DDC (2 mM) und pCMB (0.1 mM) auf die Enzymreaktion wurde untersucht. Keine der Substanzen konnte jedoch die Synthese von DHM und DHQ inhibieren.

### 2.1.3. 3',5'-Hydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit des Hydroxylierungsmusters der Flavonoide.

Die in 3'und 5'-Position hydroxylierende Aktivität konnte in Proteinextrakten aus allen Blüten, die 3',4',5'-hydroxylierte Flavonoide einschließlich Delphinidin enthalten, nachgewiesen werden. In Proteinextrakten aus roten Blüten hingegen, in denen nur 4'-hydroxylierte Flavonoide einschließlich Pelargonidin vorkommen, war diese Aktivität nicht vorhanden. Somit bestand eine eindeutige Korrelation zwischen dem Hydroxylierungsmuster der Flavonoide und der Aktivität der Flavonoid-3',5'-Hydroxylase.

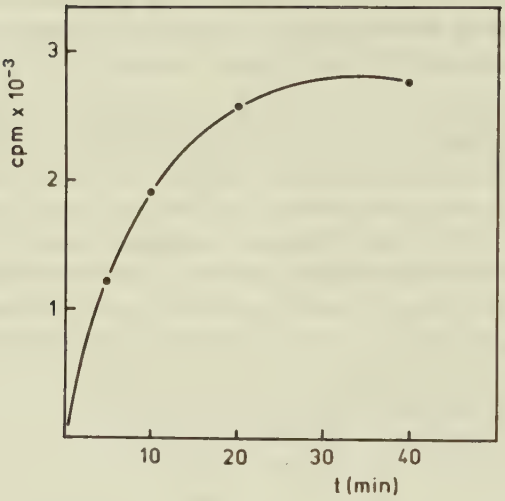



Abb. 22: Abhängigkeit der DHM-Synthese von der Inkubationszeit.

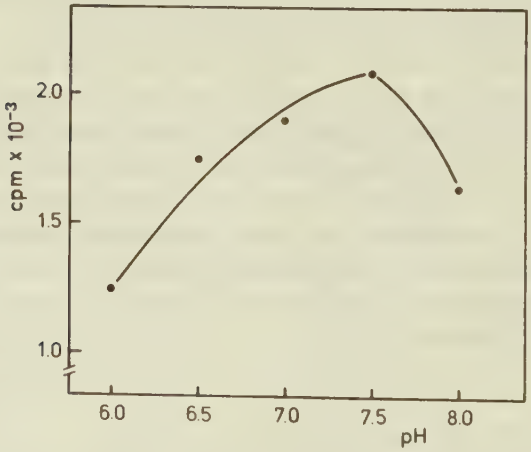



Abb. 23: pH-Abhängigkeit der 3',5'-Hydroxylierungsreaktion.

## 2.2. Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase aus Lathyrus odoratus

### 2.2.1. Pflanzenmaterial

Wie schon unter B.1.4.1. erwähnt, wird das Hydroxylierungsmuster der Anthocyane in Lathyrus durch die beiden Faktoren e und sm bestimmt. Da sm hypostatisch zu e ist, gibt es 2 verschiedene Genkombinationen, die zur Ausprägung von Delphinidin führen: E Sm und E sm. Welche genetische Situation in den blauen Blüten vorliegt, kann nur durch Kreuzungsanalyse ermittelt werden.
Wie in Verbena, so wird auch hier der Übergang vom 4′-hydroxylierten Flavonoid zum 3′,4′,5′-hydroxylierten Flavonoid nur von einem Gen (hier e) kontrolliert.
Dieses Gen e ist völlig unabhängig vom 3′-Hydroxylierungsgen sm. Dies wird im Genotyp E sm deutlich, in dem trotz rezessiver sm-Allele 3′,4′,5′-hydroxylierte Flavonoide synthetisiert werden.

Die Untersuchungen wurden an den blau-blühenden Sorten "Royal" dunkelblau, "Cuthbertson" dunkelblau und "Riesentreib Minnie" durchgeführt.
Sie enthalten Delphinidin bzw. Malvidin und andere 3′,4′,5′-hydroxylierte Flavonoide.
Als Kontrolltypen dienten der Pelargonidin-Typ "Riesentreib Ramona" und die Cyanidin-Typen "Riesentreib Carmen" und "Riesentreib Margarete".

Da bisher keine Mischungen unterschiedlich hydroxylierter Anthocyane in den Blüten gefunden worden sind, sollte eine 3′,5′-Hydroxylase-Aktivität ausschließlich in blauen, Delphinidin enthaltenden Blüten vorhanden sein.

### 2.2.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Nach Inkubation von ($^{14}$C) NAR und NADPH mit einem Rohextrakt aus blauen Blüten zeigte das Radiochromatogramm (Laufmittel CAW) 2 radioaktive Peaks. Einer der beiden radioaktiven Peaks (Rf 65) trennte sich bei der Rechromatographie in 15 % HOAc in DHK und ERI auf. Der zweite, kleinere Peak

(Rf 27) konnte durch Rechromatographie als Pentahydroxyflavanon (PHF) identifiziert werden.

Aufgrund bisheriger Ergebnisse zur subzellulären Lokalisierung von 3′- und 3′,5′-Aktivität wurde nun die Mikrosomenfraktion auf 3′,5′-Aktivität untersucht. Hierbei konnte eine verstärkte PHF-Synthese und meist auch eine leicht erhöhte ERI-Synthese beobachtet werden. Dies zeigt, daß auch die 3′,5′-Hydroxylase aus Lathyrus membrangebunden ist.

In Enzymtests mit der Mikrosomenfraktion wurden neben ERI und PHF überraschenderweise 2 weitere Produkte gebildet (Abb. 24). Das zwischen PHF und ERI lokalisierte Produkt (Rf ca 50) trat bei jedem Test in großen Mengen auf, während das zweite, zwischen NAR und ERI (Rf ca 80), meist nur in geringen Mengen vorlag, oder auch in einigen Fällen gar nicht nachweisbar war. Um welche Substanzen es

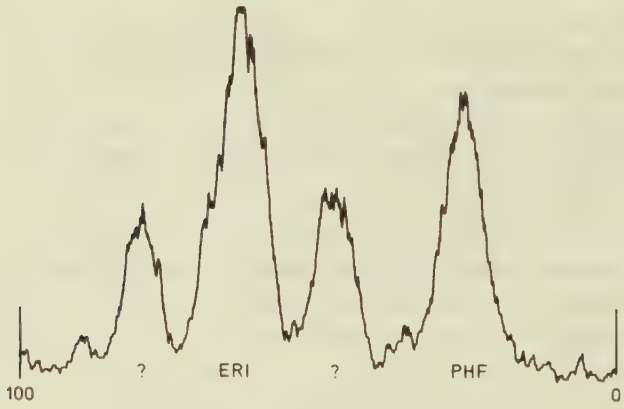



Abb. 24: Radiochromatogramm einer Inkubation von ($^{14}$C)NAR, NADPH und der Mikrosomenfraktion aus blauen Blüten von Lathyrus odoratus.

sich dabei handelt, konnte bisher nicht geklärt werden; möglicherweise sind es dieselben, die auch schon in Enzymtests der Cyanidin-führenden Linien von Petunia hybrida beobachtet wurden.

Wie die Flavonoid-3',5'-Hydroxylase aus Verbena hybrida, so benötigte auch die 3',5'-Hydroxylase aus Lathyrus NADPH als Kofaktor. NADH reduzierte die Ausbeute an allen 4 Produkten, v.a. aber die Synthese von PHF.

Eine lineare Abhängigkeit der PHF-Synthese von der Inkubationszeit konnte nicht beobachtet werden.

Das pH-Optimum der 3',5'-Hydroxylase-Aktivität, gemessen an synthetisiertem PHF, lag um pH 7.5 (Abb. 25).

Die Enzymaktivität wurde durch keine der folgenden Substanzen inhibiert: KCN, EDTA, DDC, DPC, PCMB.

Die Synthese von PHF konnte nicht nur mit NAR als Substrat beobachtet werden, sondern auch, wenn das bereits in 3',4'-Position hydroxylierte Flavanon ERI als Substrat eingesetzt wurde. Die Ausbeute an synthetisiertem PHF war aber in diesem Fall bedeutend geringer. Mit ERI als Substrat konnte auch die Synthese der beiden unbekannten Produkte (Rf 50 und Rf 80) nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, daß sie Folgeprodukte von ERI und/oder PHF darstellen.
Bei Inkubationen der Mikrosomenfraktion mit ($^{14}$C) DHK und NADPH traten ebenfalls 4 Produkte auf:
DHQ (Rf 38), DHM (Rf 15) und 2 nicht identifizierte Produkte (Rf 25 und Rf 4). Eine quantitative Auswertung dieser Enzymtests schien nicht sinnvoll, da eine große Diskrepanz zwischen eingesetzter und extrahierter Radioaktivitätsmenge bestand. Auch die Zugabe einer Spatelspitze EDTA (Britsch, 1981) nach Ablauf der Inkubationszeit konnte die Radioaktivitätsausbeute nur wenig verbessern.

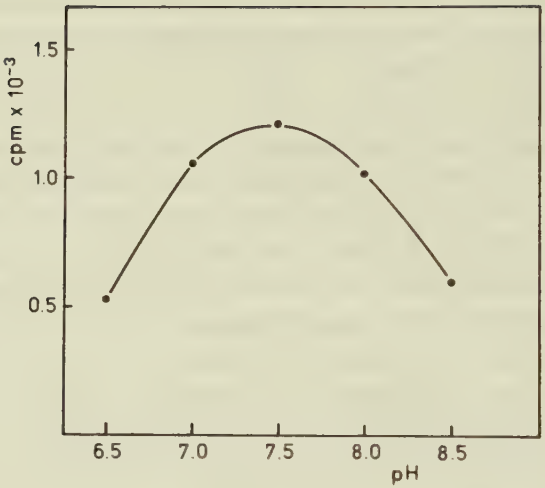



Abb. 25: pH-Abhängigkeit der 3',5'-Hydroxylase-Aktivität.

### 2.2.3. Flavonoid-3',5'-Hydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit des Hydroxylierungsmusters der Flavonoide.

Die 3',5'-Hydroxylase-Aktivität war an die Anwesenheit von Delphinidin gekoppelt. Sie konnte in Proteinextrakten aus allen 3 blauen, Delphinidin-führenden Sorten nachgewiesen werden, nicht aber in Proteinextrakten aus Cyanidin oder Pelargonidin-führenden Blüten.
In Mischexperimenten (Delphinidin-Typ + Cyanidin-Typ, Delphinidin-Typ + Pelargonidin-Typ) verhielten sich die Enzymaktivitäten additiv. Dies weist darauf hin, daß die im Cyanidin- und Pelargonidin-Typ fehlende 3',5'-Hydroxylase-Aktivität nicht auf die Wirkung eines löslichen Inhibitors zurückzuführen ist.

## 2.3. Flavonoid-3',5'-Hydroxylase aus Callistephus chinensis

### 2.3.1. Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen über die 3',5'-Hydroxylase in Callistephus chinensis wurden an genetisch definierten Linien vorgenommen.

Callistephus stellt das einzig bekannte System dar, bei dem die 3'und die 3',5'-Hydroxylierung von einem Locus über multiple Allele kontrolliert wird.

Der Delphinidin-Typ ist durch dominante RR-Allele am Locus r (B.1.5.1.) charakterisiert. Er enthält hauptsächlich Delphinidin neben wenig Cyanidin und Spuren von Pelargonidin. Stellvertretend für Delphinidin-Typen wurde die violett blühende Linie 04 untersucht. In ihr sollte aufgrund der RR-Allele eine 3',5'-hydroxylierende Enzymaktivität nachweisbar sein.

Als Kontrolltyp diente die Linie 03 (B.1.5.1.), bei welcher aufgrund rezessiver Allele (rr) keine 3',5'-hydroxylierende Enzymaktivität erwartet wurde.

Für die Untersuchungen über die 3',5'-Hydroxylierung erschien außerdem die Linie 05 (r'r) interessant, da sie neben Cyanidin auch geringe Mengen an Delphinidin enthält. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob die quantitativen Unterschiede von Delphinidin im RR- und im r'r'-Typ auf unterschiedlich hohe 3',5'-Hydroxylase-Aktivitäten zurückzuführen sind, oder ob sich prinzipielle Unterschiede hinsichtlich der 3',5'-Hydroxylierung im Cyanidin-Typ und im Delphinidin-Typ ergeben.

Wie schon erwähnt, standen aufgrund des starken Krankheitsbefalls nur sehr wenige Pflanzen für die Untersuchungen zur Verfügung.

### 2.3.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Die Flavonoid-3',5'-Hydroxylase konnte in Linie 04 unter den gleichen Bedingungen nachgewiesen werden wie in den blauen Typen von Verbena hybrida und Lathyrus odoratus.

Die aus Linie 04 präparierte Mikrosomenfraktion katalysierte in Gegenwart von NADPH den Umsatz von NAR zu ERI und PHF, wobei die Menge an synthetisiertem ERI in jedem Test höher war als die Menge an PHF (Abb. 26). Im Rohextrakt wurde meist nur die Synthese von ERI beobachtet.
Die 3',5'-Hydroxylase-Aktivität war streng NADPH-abhängig.

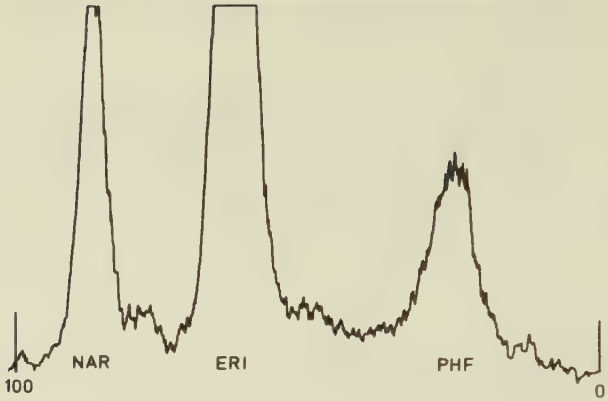



Abb. 26: Radiochromatogramm einer Inkubation von ($^{14}$C)NAR, NADPH und der Mikrosomenfraktion aus Linie 04.

NADH (0,5 mM) als Kofaktor reduzierte sie sehr stark.

($^{14}$C)NAR war das einzige Substrat, das reproduzierbar in 3′,5′-Position hydroxyliert wurde.

- Mit ($^{14}$C) DHK als Substrat konnte nur die 3′-Hydroxylierung zu DHQ beobachtet werden.
- ($^{14}$C) API wurde weder in 3′- noch in 3′,5′-Position hydroxyliert.
- ($^{14}$C) ERI wurde in sehr geringem Ausmaß zu einem Produkt umgesetzt, dessen chromatographisches Verhalten zwar für PHF sprach, das aber aufgrund der geringen Menge nicht weiter identifiziert werden konnte.

### 2.3.3. Genetische Kontrolle

Die Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase-Aktivität, gemessen an synthetisierten 3′,4′,5′-hydroxylierten Flavonoiden (PHF bzw. DHM) war ausschließlich im "Delphinidin-Typ" (RR) vorhanden. Im "Pelargonidin"-Typ (rr) oder "Cyanidin"-Typ (r′r′) war keine 3′,5′-Hydroxylase-Aktivität nachweisbar.

Die im Delphinidin-Typ gefundenen enzymatischen Verhältnisse können somit zwar das Auftreten von Delphinidin und Cyanidin erklären, nicht aber die beobachteten Konzentrationsverhältnisse. Während in vivo hauptsächlich Delphinidin und wenig Cyanidin vorliegt, wird in vitro das 3′-hydroxylierte Flavonoid in weitaus größeren Mengen synthetisiert als das 3′,5′-hydroxylierte Flavanoid.

## 2.4. Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase aus Petunia hybrida

### 2.4.1. Pflanzenmaterial

In die Untersuchungen der 3′,5′-Hydroxylierung wurden folgende weißblühende und anthocyanhaltige Genotypen einbezogen (Tab. XXII).

Tab. XXII: Chemogenetische Charakterisierung der untersuchten Genotypen und die Aktivität der Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase.

| Linie | Genotyp (homozygot) | Endprodukte (Aglyka) | Aktivität der 3′,5′-Hydroxylase |
|---|---|---|---|
| V 10 | An1 An3 htl Hf1 | Dp | + |
| V 23 | An1 An3 htl Hf1 | Dp | + |
| W 56 | An1 an3 htl Hf1 | PHF | + |
| W 24 | an1 An3 htl Hf1 | DHK | - |
| W 42 | an1 An3 Htl hf1 | Qu | - |
| W 39 | An1 an3 Htl hf1 | NAR, ERI | (+) |
| R 4 | An1 An3 htl hf1 | Km, (Dp) | (+) |

Die Anthocyangene An1, An3 und das Gen für die 3′-Hydroxylierung Ht wurden bereits unter B.1.3.1. beschrieben.

Die Hf-Gene kontrollieren die 3′,5′-Hydroxylierung des B-Rings (Wiering, 1974). Die wichtigste Rolle spielt das Hf1-Gen. Ist dieses Gen durch ein Wildtypallel vertreten, dann enthalten sowohl die äußeren Bereiche der Blüte als auch die

Blütenröhre Delphinidin-Derivate.
Das Gen Hf2, dessen Wirkung auf den äußeren Bereich der Blüte beschränkt ist, ist hypostatisch zu Hf1. Das heißt, Hf2 wird nur in Genotypen mit rezessiven Hf1-Allelen wirksam. Dominante Hf2 Allele führen dann zur Synthese von 3′,4′,5′-hydroxylierten Anthocyanen; sie ist aber viel geringer als unter der Wirkung dominanter Hf1-Allele.
Auch in Gegenwart rezessiver Allele an beiden Hf-Loci sind die Petalen nicht völlig frei von 3′,4′,5′-hydroxylierten Anthocyanen; sie enthalten auch in diesem Fall Delphinidin bzw. Petunidin oder Malvidin, allerdings in sehr geringen Mengen.

Wie schon unter B.1.3.1 beschrieben, führt die rezessive An1-Mutation zur Anreicherung von Dihydroflavonolen. Für die Untersuchungen der 3′,5′-Hydroxylierung ist diese Mutation von besonderem Interesse, da sie außerdem einen regulatorischen Effekt auf Hf1 ausübt. So akkumulieren An1-Mutanten (z.B. W 24) trotz dominanter Hf1-Allele nur DHK (Tabak et al., 1981; Gerats et al., 1982).

Für die Einführung der Hydroxyl-Gruppen in 3′und 5′-Position insbesondere auf Dihydroflavonol-Ebene sprechen Supplementationsexperimente an An3-blockierten Genotypen, die für Hf1 dominant sind. DHK konnte in den Blüten dieser Genotypen die Synthese von 3′,4′,5′-hydroxylierten Anthocyanen (Delphinidin und Petunidin) initiieren (Tabak et al., 1981).

Da bei den untersuchten Genotypen verschiedene homozygote Kombinationen der beiden Hydroxylierungsgene Ht1 und Hf1 vertreten waren und außerdem eine umfassende chemogenetische Charakterisierung dieser Genotypen vorlag, sollte Petunia hybrida ein ausgezeichnetes System darstellen, um die bisherigen Erkenntnisse über die enzymatische 3′,5′-Hydroxylierung abzusichern und zu ergänzen.

2.4.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Die Inkubation von ($^{14}$C)NAR mit Rohextrakt aus Linie W 56 oder anderen Hf-dominanten Genotypen führte in Gegenwart von NADPH zur Synthese von 2 radioaktiven Produkten, die durch Rechromatographie in 2 weiteren Laufmitteln (30% HoAc, Forestal) als ERI und PHF identifiziert wurden.
In Proteinextrakten aus Linie V 10 traten zusätzlich zu ERI und PHF 2 weitere unbekannte Produkte (Rf 75 und 36) auf. Ihre in vitro Synthese war auch schon in Extrakten der Linie R 3 (B.1.3.2.) beobachtet worden.

Wurde statt des Rohextrakts die Mikrosomenfraktion aus W 56 als Enzymquelle eingesetzt, dann erhöhte sich die Ausbeute sowohl an ERI als auch an PHF wesentlich. Im Überstand des mikrosomalen Sediments hingegen verblieb nur noch eine geringe 3',5'-Aktivität (Tab. XXIII).
Dies zeigte, daß die in vitro nachgewiesene Enzymaktivität mikrosomal gebunden ist. Außerdem wurde eine strenge NADPH-Abhängigkeit beobachtet. NADH (0.5 mM) als Kofaktor reduzierte die Synthese von ERI und PHF sehr stark (Tab. XXIII).

Während KCN (5 mM) und DDC (2 mM) die Enzymreaktion nicht hemmen konnten, wurde sie durch Zugabe von EDTA (2 mM), pCMB (0.1 mM) und DPC (0.5 mM) um ca 30% inhibiert.

Das pH-Optimum der Enzymreaktion lag in K-Pi-Puffer um pH 7.5 (Abb. 27).

PHF konnte nicht nur von NAR ausgehend gebildet werden, sondern auch mit ERI als Substrat.
Da die Supplementationsexperimente von Tabak et al. (1981) für eine 3',5'-Hydroxylierung auf Dihydroflavonol-Ebene sprachen, wurde auch ($^{14}$C) DHK auf seine Substrateigenschaft getestet. Es wurde zwar in 3'und 3',5'-Position zu DHQ und DHM hydroxyliert, die Umsatzrate war aber nicht höher als bei NAR als Substrat.
Über die Substrateigenschaften von ($^{14}$C) DHQ können noch keine gesicherten Aussagen gemacht werden, da ($^{14}$C)DHQ nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung stand.

Tab. XXIII: Subzelluläre Lokalisierung und Kofaktorabhängigkeit der Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase-Aktivität.

| Enzymquelle | Kofaktor | 3′,5′-Hydroxylierung | |
|---|---|---|---|
| | | cpm in ERI[a] | cpm in PHF[a] |
| Rohextrakt | - | 0 | 0 |
| | NADPH | 1 342 | 515 |
| Überstand des mikrosomalen Sediments | NADPH | 831 | 256 |
| Mikrosomales Sediment | - | 0 | 0 |
| | NADPH | 2 982 | 1 072 |
| | NADH | 586 | 0 |

[a] Synthese mit 50 µg Protein

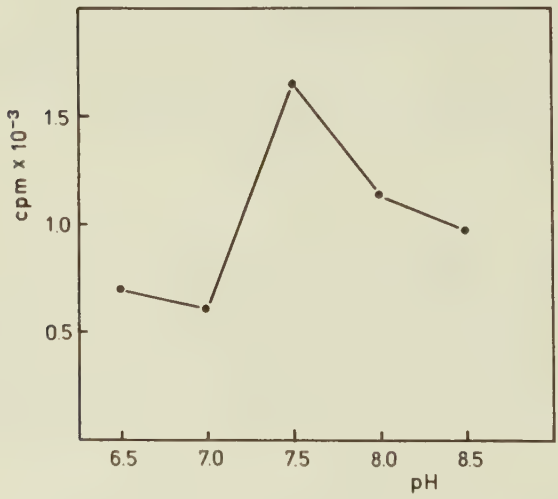



Abb. 27: pH-Abhängigkeit der 3′,5′-Hydroxylase-Aktivität (Synthese von ERI und PHF) aus Petunia hybrida.

2.4.3. Genetische Kontrolle

Wie erwartet war in allen dominanten Hf-Genotypen außer in den anl-Mutanten 3',5'-Hydroxylase-Aktivität nachweisbar (Tab. XXII). Überraschenderweise konnte aber die Synthese von PHF auch in rezessiven hf-Genotypen beobachtet werden (Tab. XXII).

Erste Untersuchungen zu diesem Problem deuteten auf einen quantitativen Unterschied der 3',5'-Hydroxylase-Aktivität in dominanten und rezessiven Genotypen hin:

- Bei vergleichbarem Blütenstadium und ähnlicher Proteinkonzentration konnte in der Linie R 4 (ht hf) nur eine geringe Synthese von PHF, ERI und den beiden unbekannten Produkten beobachtet werden, während die Mikrosomenfraktion der Linie V 10 (ht Hf) einen erheblich größeren Umsatz zu PHF und dem Produkt Rf 39 katalysierte.
- Die Rohextrakte aus 6 verschiedenen Blütenstadien des hf-rezessiven Genotyps R 4 enthielten ähnlich geringe 3',5'-Hydroxylase-Aktivitäten. Hingegen war im Blütenstadium 1 des dominanten Genotyps (V 10) die 3',5'-Hydroxylase-Aktivität stark erhöht, während im letzten Blütenstadium ebenfalls nur eine geringe Grundaktivität nachweisbar war. Die Blütenstadien 2-5 wurden noch nicht untersucht.

Die 3',5'-Hydroxylase-Aktivität zeigte in den anl-Mutanten W 42 und W 24 ein völlig anderes Verhalten.
Sowohl in Enzymtests mit Extrakten aus dem Hf-dominanten Genotyp als auch in Tests mit Extrakten aus dem hf-rezessiven Genotyp wurde kein PHF synthetisiert (Tab. XXIV).

Tab. XXIV: Synthese von PHF und ERI in den anl-Mutanten W 42 und W 24.

| Linie | Genotyp (homozygot) | Synthese von ERI | Synthese von PHF |
|---|---|---|---|
| W 42 | anl Htl hfl | + | - |
| W 24 | anl htl Hfl | - | - |

## IV. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß Oxygenase-Reaktionen in der Flavonoid-Biosynthese eine wichtige Rolle spielen. Oxygenasen sind Enzyme, welche die Inkorporation von molekularem Sauerstoff in ein Substrat katalysieren. An der Flavonoid-Biosynthese sind sowohl Monooxygenasen als auch Dioxygenasen beteiligt.

Monooxygenasen oder mischfunktionelle Oxygenasen (Ullrich und Duppel, 1975; Hayaishi, 1974) übertragen nur ein Atom des Sauerstoffmoleküls auf das Substrat, während das zweite in Gegenwart eines Elektronendonors zu $H_2O$ reduziert wird:

$$X + O_2 + DH_2 \longrightarrow XO + H_2O + D$$

X = Substrat, $DH_2$ = Elektronendonator

Der Elektronendonator ist bei vielen Reaktionen $NADPH_2$ oder $NADH_2$. Aber auch $FADH_2$, Tetrahydropterin oder Ascorbinsäure können als Kofaktoren dienen.

Der Begriff Monooxygenase basiert auf der allgemeinen Reaktionsgleichung nicht jedoch auf dem genauen Reaktionsmechanismus. So besteht das Monooxygenase-System aus einem Multienzymkomplex, bei dem Elektronen von $NADPH_2$ über ein Redoxsystem auf die terminale Oxidase, die den Sauerstoff bindet und ihn mit Hilfe der Elektronen aktiviert, übertragen werden. Das Monooxygenase-System wird in erster Linie durch die Natur ihrer terminalen Oxidase charakterisiert. Die häufigsten terminalen Oxidasen sind Eisen(II)- und Kupfer(I)-Komplexe. Am besten untersucht sind bisher die eisenhaltigen Monooxygenasen mit Cytochrom P-450 als terminaler Oxidase. Entsprechende Enzyme lassen sich in der Mikrosomenfraktion der Säugetierleber nachweisen (Orrenius und Ernster, 1974). Aber auch pflanzliche Enzyme wie die Zimtsäure-4-Hydroxylase gehören zu den Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen (Potts et al., 1974, Benveniste, 1977).
Erste Untersuchungen der Flavonoid-3′-Hydroxylase (Fritsch und Grisebach, 1975; Forkmann et al., 1980) zeigten, daß die-

ses Enzym der eigentlichen Flavonoid-Biosynthese ebenfalls zur Gruppe der Monooxygenasen gehört.

Dioxygenasen (Abbott und Udenfriend, 1974) katalysieren Reaktionen, bei denen beide Sauerstoffatome in ein oder zwei Substrat(e) eingebaut werden.
Eine wichtige Gruppe innerhalb der Dioxygenasen stellen die 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen dar, die das eine Sauerstoffatom auf das zu oxygenierende Substrat und das andere auf das Kosubstrat 2-Oxoglutarsäure übertragen. 2-Oxoglutarat wird dabei oxidativ zu Succinat decarboxyliert. Die allgemeine Reaktionsgleichung lautet:

$$X + O_2 + \text{2-Oxoglutarat} \xrightarrow[\text{reduzierendes Agens}]{Fe2+} XO + \text{Succinat} + CO_2$$

Als spezifischen Kofaktor benötigt die Reaktion $Fe^{2+}$, während die Rolle des reduzierenden Agens von verschiedenen Substanzen, häufig jedoch von Ascorbat übernommen werden kann.

In der Literatur sind bisher nur wenige 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen beschrieben worden. Ihr Nachweis gelang sowohl in Mikroorganismen und Tieren, als auch in Pflanzen.
Die ersten Hinweise, daß sie auch in der Flavonoid-Biosynthese eine wichtige Rolle spielen, gaben die enzymatischen Untersuchungen an Levkojen-Blüten (Forkmann et al., 1980) und Petersilie-Zellkulturen (Britsch et al., 1981).

Durch die vorliegende Arbeit wurden weitere Ergebnisse hinsichtlich der an der Flavonoid-Biosynthese beteiligten Monooxygenasen und Dioxygenasen erhalten.
Sie werden im Folgenden getrennt nach Enzymen diskutiert.

1. Zimtsäure-4-Hydroxylase

Untersuchungen über die Zimtsäure-4-Hydroxylase dienten insbesondere dazu, methodische Erfahrungen in der Präparation und im Nachweis eines hydroxylierenden, mikrosomalen Enzyms zu sammeln. Dieses Enzym wurde dafür ausgewählt, weil es bereits in verschiedenen Zelltypen und in einer großen Anzahl von Pflanzengattungen nachgewiesen und charakterisiert worden war. Es sollte untersucht werden, ob es sich unter ähnlichen Bedingungen wie in der Literatur beschrieben, auch in Blüten nachweisen läßt. Die an Hand dieses bekannten Enzyms gewonnenen Erfahrungen sollten dann als Grundlage für die Untersuchung der in der eigentlichen Flavonoid-Biosynthese beteiligten, hydroxylierenden Enzyme dienen. Für die Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Zellkulturen von Haplopappus gracilis (Fritsch und Grisebach, 1975) und aus Blüten von Matthiola incana (Forkmann et al., 1980) war schon gezeigt worden, daß dieses Enzym ebenso wie die Zimtsäure-4-Hydroxylase in der Mikrosomenfraktion lokalisiert ist.

Die Zimtsäure-4-Hydroxylase konnte mit Erfolg in der weißblühenden Linie 17 von Matthiola incana nachgewiesen werden. Überraschenderweise war dies die einzige Linie bzw. Pflanzengattung, in welcher der Nachweis reproduzierbar gelang. Wechselnde Aktivitäten waren in einer anthocyanhaltigen Linie und einer weiteren weißblühenden Linie (Linie 16 bzw. 18) zu beobachten. In Proteinextrakten aus elfenbeinfarbenen Blüten von Antirrhinum majus und aus roten und gelben Blüten von Dianthus caryophyllus war keine Aktivität meßbar. Allerdings sind diese letzteren Untersuchungen nur in geringem Umfang durchgeführt worden.

Ebenso wie die in der Literatur beschriebene Zimtsäure-4-Hydroxylase besitzt das Enzym aus Blüten von Matthiola incana (Linie 17) die für Monooxygenasen typischen Eigenschaften: Sie ist membrangebunden und $O_2$- und NADPH-abhängig. Das pH-Optimum (pH 8.0) der Zimtsäure-4-Hydroxylase lag geringfügig höher als das für das Enzym aus Petersilie-Suspensionskulturen (Grisebach und Hahlbrock, 1974), Erbsenkeim-

lingen (Russell und Conn, 1967) und Daucus carota (Noé, 1982) ermittelte pH-Optimum von pH 7.5.
Die Enzymreaktion war nur 5 bis maximal 10 min linear. Die Reaktion der Zimtsäure-4-Hydroxylase aus Erbsenkeimlingen hingegen verlief bis zu 30 min linear (Russell, 1971). Für das Enzym aus Daucus carota wurde sogar eine Linearität bis zu 2 h beschrieben (Noé, 1982).
Halbgeöffnete Levkojenblüten (Winkel ca $90^{o}$) erwiesen sich als das geeignetste Blütenstadium für den Nachweis der Zimtsäure-4-Hydroxylase. In diesem Blütenstadium war die Enzymaktivität maximal.
Die Aktivität der Zimtsäure-4-Hydroxylase zeigte damit einen ähnlichen Verlauf wie die p-Cumarat-CoA-Ligase aus Matthiola incana (Dangelmayr, 1982). Dies könnte auf eine koordinierte Ausprägung der Enzymaktivitäten des Phenylpropanstoffwechsels hindeuten, wie sie insbesondere für die entsprechenden Enzyme aus Petersilie-Zellkulturen beschrieben worden ist (Hahlbrock et al., 1971).

Obwohl nur eine Linie von Matthiola incana genauer untersucht worden war, so zeigen doch die Experimente, daß ein positiver Nachweis der Zimtsäure-4-Hydroxylase auch in Blütenextrakten erbracht werden kann. Die Eigenschaften dieses Enzyms entsprechen weitgehend denen, die für das Enzym aus anderen Geweben ermittelt wurden.

2. Flavanon-3-Hydroxylase

a) Eigenschaften

Der erste positive Nachweis der Flavanon-3-Hydroxylase, einer 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase, gelang Forkmann et al. (1980) in Blüten von Matthiola incana. Ergänzend zu den bekannten Eigenschaften der Flavanon-3-Hydroxylase in dieser Pflanzengattung wurde der Aktivitätsverlauf dieses Enzyms über 8 morphologisch unterscheidbare Blütenstadien verfolgt.
Die Enzymaktivität zeigte bereits in einem sehr frühen Stadium der Blütenentwicklung (Stadium 2) ein deutliches Maximum und in den nächsten Stadien einen langsamen Abfall. Dieser Aktivitätsverlauf gab einen Hinweis darauf, welche Blütenstadien sowohl für den Nachweis dieser Enzymaktivität in anderen Pflanzen als auch für den Nachweis bisher unbekannter Enzyme der Flavonoid-Biosynthese erfolgversprechend sein sollten. Zudem ist die Kenntnis des Aktivitätsverlaufs auch für Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene von großer Bedeutung. So sollte für die Isolierung der Flavanon-3-Hydroxylase spezifischen m-RNA das Stadium 1 oder ein noch früheres Stadium geeignet sein.

Der erfolgreiche Nachweis der Flavanon-3-Hydroxylase in Matthiola incana eröffnete die Möglichkeit, dieses Enzym in einer Reihe von weiteren Pflanzengattungen (A. majus, Petunia hybrida, Streptocarpus, Verbena, Zinnia, Dahlia) zu untersuchen. Der Nachweis dieser Enzymaktivität in den jeweiligen anthocyanhaltigen Blüten gelang in allen Fällen ohne Schwierigkeiten.

Die wichtigste Gemeinsamkeit aller untersuchten Flavanon-3-Hydroxylasen ist ihre Abhängigkeit von 2-Oxoglutarat, Ascorbat und Eisen. 2-Oxoglutarat spielt dabei die wichtigste Rolle, während Ascorbat und $Fe^{2+}$ die Enzymaktivität aus den verschiedenen Pflanzengattungen unterschiedlich stark beeinflussen.

Aus diesen Kofaktorabhängigkeiten läßt sich die Zuordnung der Flavanon-3-Hydroxylase aus allen untersuchten Pflanzengattungen zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Abbott und Udenfriend, 1974) ableiten.

Wie die 3-Hydroxylase aus Matthiola, so waren auch die 3-Hydroxylasen aus den untersuchten Pflanzengattungen durch EDTA (2 mM), KCN (5 mM) und DDC (2 mM) zwischen 50 und 100% hemmbar. EDTA und KCN sind als Komplexbildner spezifische Inhibitoren für Eisen-abhängige Enzyme.

Die im Cytoplasma lokalisierte 3-Hydroxylase katalysierte in allen Fällen die Hydroxylierung von Naringenin zu Dihydrokämpferol. Wie in Matthiola incana scheint jedoch die enzymatische 3-Hydroxylierung nicht auf die Hydroxylierung von Naringenin beschränkt zu sein. So konnte in Blütenextrakten aus Löwenmaul, Petunien, Streptocarpus, Verbenen und Zinnien zusätzlich die Hydroxylierung von Eriodictyol zu Dihydroquercetin und in Blütenextrakten von Verbenen ferner die Hydroxylierung von Pentahydroxyflavanon zu Dihydromyricetin beobachtet werden.
Dieses Ergebnis steht mit den Substratspezifitäten der Flavonoid-3′-Hydroxylase bzw. 3′,5′-Hydroxylase in voller Übereinstimmung. Diese Enzyme werden bevorzugt auf Flavanon-Ebene wirksam und führen so zu höher oxidierten Flavanonen, welche dann ebenfalls über die Flavanon-3-Hydroxylase-Reaktion in die entsprechenden Dihydroflavonole überführt werden können.

Das pH-Optimum, das bei A. majus geprüft wurde, lag um pH 7.5. Dieser Wert entspricht dem pH-Optimum des Enzyms aus Matthiola incana.

Die Flavanon-3-Hydroxylase aus A. majus zeigt eine Besonderheit hinsichtlich ihres Nachweises in verschiedenen Puffersystemen. Während die Enzymaktivitäten aus allen anderen Pflanzengattungen sowohl in K-Pi-Puffer als auch in Tris/HCl-Puffer beobachtet werden konnten, war die 3-Hydroxylase aus A. majus nur in Tris/HCl-Puffer nachweisbar.

Parallel zu den vorliegenden Untersuchungen konnte die Flavanon-3-Hydroxylase auch in belichteten Suspensionskulturen von Petroselinum hort. nachgewiesen (Britsch et al., 1981) werden. Das Enzym zeigt die für 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen typischen Kofaktorabhängigkeiten, es kann sowohl NAR als auch ERI als Substrat verwenden und ist durch KCN und EDTA hemmbar.
Offensichtlich wird der Schritt von den Flavanonen zu den Dihydroflavonolen sowohl im differenzierten Gewebe (Blüte) als auch im un- bzw. dedifferenzierten Gewebe (Zellkultur) vom gleichen Enzym katalysiert.

b) Genetische Kontrolle

Die Flavanon-3-Hydroxylase aus Matthiola katalysierte zwar in vitro die Hydroxylierung von Flavanonen zu Dihydroflavonolen, ob sie aber für diesen Schritt auch in vivo verantwortlich ist, konnte nicht mit Sicherheit belegt werden. Ein eindeutiger Beweis kann erst durch die Korrelation zwischen der Enzymaktivität und dem für die 3-Hydroxylierung verantwortlichen Gen erbracht werden.

Während bei Matthiola incana keine Mutation bekannt ist, die den Schritt Flavanon ⟶ Dihydroflavonol betrifft, sind bei A. majus und Petunia hybrida Mutanten dieser Art beschrieben und chemogenetisch charakterisiert worden.

Bei A. majus ist in Gegenwart rezessiver Allele am Locus inc die Anthocyansynthese blockiert, die Blüten reichern Flavanone und Flavone an (Geissman et al., 1954). Durch Supplementation mit Dihydroflavonolen kann der Block überwunden werden, das heißt, Anthocyane werden synthetisiert. Flavanone sind dagegen unwirksam (Stickland and Harrison, 1974; Harrison and Stickland, 1974).
Dieselben Befunde wurden auch für die rezessive Mutation am An3-Locus von Petunia hybrida erhalten (Kho et al., 1975). In diesem Fall werden allerdings nur Flavanone akkumuliert, da Petunien keine Flavone synthetisieren.

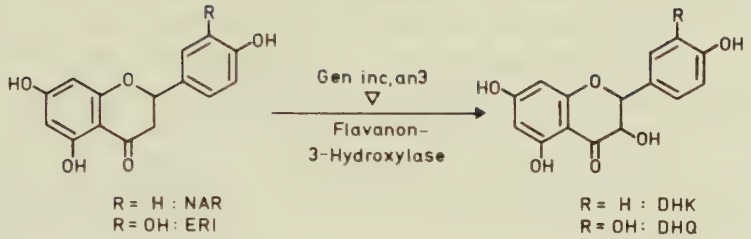



Abb. 28: Genetische Kontrolle der Flavanon-3-Hydroxylase aus A. majus und Petunia hybr.

Die chemogenetischen Analysen und Supplementationsexperimente wiesen darauf hin, daß das Gen inc bzw. an3 die Umwandlung Flavanon ⟶ Dihydroflavonol betrifft.

Durch den Nachweis der Flavanon-3-Hydroxylase war es nun möglich, die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Allelsituation am Locus inc bzw. an3 zu untersuchen.
Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität wurde in allen Genotypen mit Wildtypallelen am Locus inc bzw. an3 beobachtet.
In Genotypen mit den jeweiligen rezessiven Allelen war hingegen keine 3-Hydroxylase-Aktivität nachweisbar. Der Ausfall der 3-Hydroxylase-Aktivität ist offensichtlich mit der Anwesenheit von rezessiven Allelen gekoppelt. Die Existenz eines löslichen Inhibitors konnte dabei ausgeschlossen werden.
Damit konnte zum ersten Mal eine Korrelation zwischen Gen (inc, an3) und Flavanon-3-Hydroxylase belegt werden.
Das beweist, daß die Flavanon-3-Hydroxylase auch in vivo den Schritt von den Flavanonen zu den Dihydroflavonolen katalysiert. (Abb. 28)

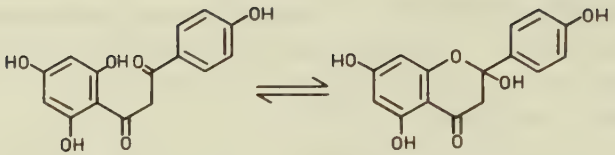
Bei Streptocarpus, Verbena, Zinnia und Dahlia gibt es nicht nur anthocyanhaltige, sondern auch weißblühende Sorten.

Die weißen Blüten dieser Pflanzengattungen - weiße Blüten von Dahlien ausgenommen - konnten mit Dihydroquercetin erfolgreich supplementiert werden, nicht jedoch mit Naringenin. Dies ließ vermuten, daß auch in diesen Blüten der Schritt von den Flavanonen zu den Dihydroflavonolen betroffen ist. Auch die Anreicherung von Flavonen als einzige Flavonoid-Klasse in weißen Blüten dieser Gattungen sprach für diese Hypothese. Enzymologische Untersuchungen zur Aktivität der Flavanon-3-Hydroxylase führten nun zu einer eindeutigen Klärung dieser Situation.
Während in Proteinextrakten aus den jeweiligen anthocyanhaltigen Blüten Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität ohne Schwierigkeiten nachweisbar war, fehlte diese Enzymaktivität in den Proteinextrakten aus den entsprechenden weißen Blüten völlig. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Supplementationsexperimente und der Analyse der angereicherten Flavonoide bedeutet dies, daß der Block in der Anthocyanbiosynthese bei weißen Blüten der genannten Pflanzengattungen auf den Ausfall der Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität zurückzuführen ist.
In weißen Blüten von Dahlien ist die Anthocyansynthese offensichtlich noch an einer anderen Stelle blockiert. Dieser zweite Block scheint zwischen der Dihydroflavonol- und der Anthocyanebene zu liegen, da die Fütterung von DHQ die Anthocyansynthese nicht initiieren konnte.

Damit stehen bereits 6 verschiedene Pflanzengattungen für weitergehende molekularbiologische Untersuchungen zur Frage nach den Ursachen für den Ausfall der Flavanon-3-Hydroxylase-Aktivität zur Verfügung.

Dieses Enzym wurde erstmalig in Blüten von A. majus nachgewiesen. Die Enzymaktivität war membrangebunden und von $O_2$ und NADPH abhängig. Aufgrund dieser Charakteristika kann die Flavanon-Oxidase zur Gruppe der Monooxygenasen gezählt werden (Ullrich und Duppel, 1975).

Als Reaktionsmechanismus für die Einführung der Doppelbindung in das Flavanon-Molekül ist eine Hydroxylierung mit nachfolgender $H_2O$-Abspaltung vorstellbar.
Ein solcher Mechanismus wird auch für die Einführung einer cis-Doppelbindung bei der Synthese von ungesättigten Fettsäuren diskutiert (Kunau, 1976). Die diese Reaktion katalysierenden Desaturasen, die bei Mikroorganismen, Tieren und Pflanzen vorkommen, benötigen ebenfalls $O_2$ und NADPH oder NADH.
Hydroxylierte Verbindungen, die als Zwischenprodukte postuliert werden, ließen sich aber weder bei der Synthese der ungesättigten Fettsäuren noch bei der Flavonbildung nachweisen.
Im Falle der Flavonbildung könnten die Zwischenprodukte theoretisch in C-2 oder C-3-Position des Heterozyklus hydroxyliert sein.
Eine Hydroxylierung des C-3 Atoms erscheint unwahrscheinlich, da diese Hydroxylierung zur Synthese von Dihydroflavonolen führt, und das für diese Reaktion verantwortliche Enzym, die Flavanon-3-Hydroxylase, zur Gruppe der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen gehört.
Für die Hydroxylierung in C-2-Position spricht hingegen, daß sowohl 2-Hydroxyflavanone als auch die tautomeren Verbindungen 2-Hydroxydibenzoylmethane (Abb. 29) schon in der Natur gefunden worden sind (Williams, 1967; Chadenson et al., 1972; Traub und Geiger, 1975).
Auch bei der chemischen Synthese der Flavone treten diese Zwischenprodukte auf (Baker, 1933).
Da radioaktiv markiertes 2-Hydroxydibenzoylmethan kein geeigneter Precursor für Flavone darstellte (Schill und Grisebach, unveröffentlicht), kommen somit 2-Hydroxyflavanone als hypo-



1 2

Abb. 29: Grundgerüst der 2-Hydroxyflavanone (2) bzw. 2-Hydroxydibenzoylmethane (1).

thetische Zwischenprodukte am ehesten in Betracht.

Eine bemerkenswerte Eigenschaft der Flavanon-Oxidase-Reaktion ist ihre kurze Linearität in Abhängigkeit der Zeit. Voringkubationen von 10 min bei 30°C reduzierten außerdem die Ausbeute an Apigenin auf ca 50 % gegenüber der Kontrolle. Diese Experimente ließen vermuten, daß die äußerst kurze Linearität der Enzymreaktion auf die Temperatursensitivität des membrangebundenen Enzyms zurückzuführen ist. Die Zimtsäure-4-Hydroxylase, ebenfalls in der Mikrosomenfraktion lokalisiert, hatte ein ähnliches Verhalten gezeigt.

Die Flavanon-Oxidase katalysiert die Oxidation von Naringenin zu Apigenin bzw. von Eriodictyol zu Luteolin. Mit Eriodictyol als Substrat beträgt der Umsatz ca 40 % gegenüber Naringenin als Substrat.
Daß Flavanone und nicht Chalkone die Substrate für die Flavonbildung sind, konnte bei den enzymatischen Untersuchungen der Flavonsynthese in jungen Primärblättern von Petersilie gezeigt werden (Sutter et al., 1975). Während in Inkubationen mit markiertem 4,2',4'-Trihydroxychalkon, das eine höhere Stabilität aufweist als 4,2',4',6'-Tetrahydroxychalkon, keine Flavone synthetisiert wurden, gelang dies mit dem entsprechenden Flavanon Liquiritigenin. Auch aus chemogenetischen Analysen und enzymatischen Untersuchungen bei Callistephus chinensis wurde deutlich, daß die Flavonbiosynthese nicht von den Chalkonen ausgeht (Kuhn et al., 1978). Die Akkumulation von Chalkonen, die auf einen Ausfall der Chalkon-Isomerase-Akti-

vität beruht, geht mit einer drastischen Verminderung von Flavonen und anderen höher oxidierten Flavonoiden einher. Die Flavanon-Oxidase aus A. majus ist spezifisch für die Oxidation von Flavanonen. Dihydroflavonole, die im Hinblick auf die Flavonolbildung geprüft wurden, werden nicht umgesetzt.

Da sich Flavanon-Oxidase und Flavonoid-3′-Hydroxylase bzw. Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase aufgrund gleicher subzellulärer Lokalisierung und Kofaktorabhängigkeit nicht voneinander trennen ließen, war in Enzymtests mit Proteinextrakten aus Cyanidin-führenden Linien von A. majus nicht nur die Synthese von Apigenin, sondern auch von Luteolin zu beobachten. In Enzymtests mit Proteinextrakten aus Delphinidin-führenden Blüten von Verbena hybrida trat zusätzlich Tricetin auf. Die Substratspezifitäten der Flavanon-Oxidase und Flavonoid-3′-Hydroxylase aus A. majus weisen darauf hin, daß Luteolin über Eriodictyol und nicht über Apigenin synthetisiert wird. Entsprechende Hinweise zur Klärung der Tricetin-Synthese in Verbena hybrida liegen noch nicht vor.

Die Flavanon-Oxidase-Aktivität konnte in Blütenextrakten aus einer Reihe von Pflanzengattungen mit Erfolg nachgewiesen werden, so in Blütenextrakten aus A. majus, Taraxacum officinale, Zinnia elegans, Verbena hybrida, Dahlia variabilis und Gerbera jamesonii. In allen Fällen handelte es sich um das gleiche Enzymsystem.

Ein Gen, das den Schritt von den Flavanonen zu den Flavonen kontrolliert, ist bisher nicht bekannt. Deshalb konnte nicht exakt bewiesen werden, daß die in vitro nachgewiesene Flavanon-Oxidase-Aktivität auch in vivo die Flavonbildung katalysiert.

Die Korrelation zwischen der Enzymaktivität und dem Vorhandensein von Flavonen spricht jedoch dafür, daß dieser Flavanon-Oxidase-Aktivität auch in vivo eine Bedeutung zukommt. So ist die Flavanon-Oxidase nur in solchen Blüten nachweisbar, die Flavone enthalten, während sie in flavonfreien Blüten (Matthiola incana, Petunia hybrida) fehlt.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen über die Flavanon-Oxidase aus Blüten, handelte es sich bei dem von Sutter et al. (1975) beschriebenen Apigenin-synthetisierenden Enzym aus jungen Primärblättern von Petersilie um ein lösliches Enzym, dessen Aktivität von $O_2$, $Fe^{2+}$ und einem hitzestabilen Kofaktor abhängig war. Eine Zuordnung der Enzymaktivität zu einer bestimmten Enzymklasse war nicht möglich, weil insbesondere der hitzestabile Kofaktor noch nicht bekannt war.

Dieser Kofaktor wurde später von Britsch et al. (1981) als 2-Oxoglutarsäure identifiziert. Sie konnten zeigen, daß Rohextrakte aus belichteten Suspensionskulturen von Petersilie in Abhängigkeit von 2-Oxoglutarat, Ascorbat und $Fe^{2+}$ nicht nur die Synthese von Dihydrokämpferol und Kämpferol, sondern auch die Synthese von Apigenin katalysieren.
Die Enzymreaktion von Naringenin zu Apigenin hat ein pH-Optimum von pH 7.0 und ist durch EDTA (1 mM) und KCN (5 mM) hemmbar. Neben NAR dient auch Eriodictyol als Substrat. Das flavonbildende Enzym aus jungen Primärblättern und aus Zellkulturen von Petersilie konnte zweifelsfrei zur Gruppe der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen gerechnet werden.

Diese bemerkenswerte Tatsache bedeutet, daß die Flavone über unterschiedliche Enzymsysteme (Monooxygenase- bzw. Dioxygenase-System) synthetisiert werden können.

Das Vorliegen des Monooxygenase-Enzyms in Blüten verschiedener Pflanzengattungen einerseits und das Vorkommen des Dioxygenase-Enzyms in Blättern bzw. Zellkulturen der Petersilie andererseits, läßt an einen gewebespezifischen Unterschied des flavonbildenden Enzyms denken. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte die Flavonsynthese in Blättern der untersuchten Blütenpflanzen aufgeklärt werden.

4. Flavonoid-3′-Hydroxylase

Der erste eindeutige Nachweis einer spezifischen 3′-Hydroxylierung konnte von Forkmann et al. (1980) an definierten Genotypen von Matthiola incana erbracht werden.
Es handelte sich dabei um ein mikrosomales, NADPH-abhängiges Enzym, das aufgrund dieser Eigenschaften zu den Monooxygenasen gerechnet wurde.

a) Eigenschaften in Blüten

Ergänzend zu den bereits bekannten Eigenschaften der Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Matthiola incana wurde der Aktivitätsverlauf des Enzyms während der Blütenentwicklung untersucht. Ausgehend von einer geringen Aktivität im kleinsten Knospenstadium stieg die Enzymaktivität steil an, so daß in Stadium 3 und 4 das Aktivitätsmaximum erreicht war. Danach fiel die Aktivität wieder steil ab.
Damit zeigt die 3′-Hydroxylase einen sehr ähnlichen Aktivitätsverlauf wie die Flavanon-3-Hydroxylase und insbesondere wie das ebenfalls modifizierende Enzym Flavonoid-3-Glucosyltransferase aus Matthiola (Dangelmayr et al., 1983). Diese Enzyme unterscheiden sich hingegen im Anstieg der Enzymaktivität von den beiden in der Flavonoidbiosynthese früher wirksam werdenden Enzymen Chalkon-Synthase und Chalkon-Isomerase, bei denen schon in den kleinsten Knospen fast maximale Aktivität vorhanden ist (Dangelmayr et al., 1983). Der Zeitpunkt der Aktivitätsmaxima befindet sich in Übereinstimmung mit dem Anthocyangehalt der Blüten, der in Stadium 4 sein Maximum erreicht hat (Dangelmayr et al., 1983).

Die Untersuchungen der Flavonoid-3′-Hydroxylase wurden auf Cyanidin-haltige Blüten von A. majus, Petunia hybrida, Lathyrus odoratus und Callistephus chinensis ausgedehnt, um zu überprüfen, inwieweit die Eigenschaften der Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Matthiola auch für 3′-Hydroxylasen aus anderen Pflanzengattungen gültig sind.

Die subzelluläre Lokalisation in der Mikrosomenfraktion und die Abhängigkeit von NADPH klassifizieren die Flavonoid-3′-Hydroxylasen aus allen untersuchten Pflanzengattungen als mischfunktionelle Oxygenase oder Monooxygenase (Ullrich und Duppel, 1975).

Das bevorzugte Substrat der 3′-Hydroxylasen ist Naringenin. Während bei Antirrhinum und Callistephus mit Dihydrokämpferol keine bzw. keine eindeutige 3′-Hydroxylierung beobachtet wird, katalysieren Proteinextrakte aus Petunien und Wicken einen geringen Umsatz von Dihydrokämpferol zu Dihydroquercetin. Die 3′-Hydroxylase scheint für Substrate spezifisch zu sein, die nur in 4′-Position hydroxyliert sind, da sie 3′,4′-hydroxylierte Flavonoide wie ERI nicht noch in 5′-Position hydroxyliert.

Da bei Amajus aufgrund der Anwesenheit der Flavanon-Oxidase keine separate Untersuchung der 3′-Hydroxylase möglich war und bei C. chinensis nur eine äußerst geringe 3′-Hydroxylase-Aktivität beobachtet wurde, konnten die 3′-Hydroxylasen aus diesen beiden Pflanzengattungen nicht näher charakterisiert werden.

Die Enzymreaktion der 3′-Hydroxylase aus Petunia und Lathyrus verläuft nur über wenige Minuten linear. Diese Beobachtung trifft auch für das Enzym aus Matthiola zu. Dafür ist möglicherweise die Temperatursensitivität des membrangebundenen Enzymsystems verantwortlich. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die membrangebundenen Enzyme Zimtsäure-4-Hydroxylase und Flavanon-Oxidase.

Von den getesteten Inhibitoren EDTA, KCN, DDC, DPC und pCMB reduziert DPC die Aktivität der 3′-Hydroxylase aus Petunien geringfügig (30%). Für die Aktivität aus Matthiola hingegen sind DPC und KCN äußerst starke Inhibitoren.

Die pH-Optima der Enzymaktivitäten aus Levkojen, Petunien und Wicken liegen mit pH 7.2, 7.5 und 8.0 in einem ähnlichen Bereich.

Bei den 3′-Hydroxylasen aus Blüten verschiedener Pflanzengattungen, handelt es sich offensichtlich um Monooxygenasen, die sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen.

In der Mikrosomenfraktion aus Suspensionskulturen von Petroselinum hortense wurde mittlerweile ebenfalls eine NADPH-abhängige 3′-Hydroxylase-Aktivität nachgewiesen (Britsch et al., 1981). Sie katalysiert die Hydroxylierung von Naringenin zu Eriodictyol. Dihydrokämpferol ist kein Substrat.

b) Genetische Kontrolle

Eine genetische Kontrolle der Flavonoid-3′-Hydroxylase konnte zum ersten Mal für das Enzym aus Matthiola incana nachgewiesen werden (Forkmann et al., 1980).

Da auch bei A. majus, Petunia hybrida, Callistephus chinensis und Lathyrus odoratus Gene bekannt sind, welche die 3′-Hydroxylierung des B-Rings der Flavonoide betreffen, konnte nachgeprüft werden, ob die in diesen Gattungen beobachtete Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität ebenfalls unter genetischer Kontrolle steht. Die Beantwortung dieser Frage ist für die Diskussion um den Zeitpunkt der Substitution des B-Rings von großer Bedeutung.

Wildtypallele an den Loci eos bei A. majus und ht bei Petunia hybrida führen zu Cyanidin und anderen 3′,4′-hydroxylierten Flavonoiden. In Gegenwart rezessiver eos-Allele finden sich in Blüten von A. majus nur 4′-hydroxylierte Flavonoide einschließlich Pelargonidin. Als eine Besonderheit von Petunia hybrida enthalten die rezessiven Typen dieser Gattung kein Pelargonidin; stattdessen wird Kämpferol angereichert. Diese chemogenetischen Analysen wiesen darauf hin, daß das Gen eos bzw. ht für die Einführung der 3′-OH-Gruppe in das Flavonoid-Molekül verantwortlich ist.

In Übereinstimmung mit den chemogenetischen Analysen war Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität aus A. majus nur in Blütenextrakten aus Wildtypen (Eos) vorhanden. In Blütenex-

trakten aus rezessiven Genotypen hingegen war keine 3′-Hydroxylase-Aktivität nachweisbar. Mischexperimente mit dominanten und rezessiven Genotypen zeigten, daß für die fehlende Enzymaktivität im rezessiven Typ kein löslicher Inhibitor verantwortlich ist. Somit kann die Flavonoid-3′-Hydroxylase aus A. majus eindeutig mit dem Gen eos korreliert werden, ein Beweis dafür, daß die in vitro nachgewiesene Enzymaktivität auch in vivo für die Hydroxylierung des B-Rings verantwortlich ist.
Dieses Ergebnis steht mit den Untersuchungen zur Substratspezifität der Chalkonsynthase in Einklang, die unabhängig von der Allelsituation am Locus eos nur p-Cumaroyl-CoA als Substrat verwendet (Spribille und Forkmann, 1982a).
Flavanone sind bei A. majus Zwischenprodukte bei der Synthese von Anthocyanidinen, Flavonolen und Flavonen, deren Hydroxylierungsmuster gemeinsam von eos kontrolliert wird. Durch den Nachweis der 3′-Hydroxylierung auf Flavanon-Ebene kann die Wirkung von eos auf das Hydroxylierungsmuster aller 3 Endprodukte leicht erklärt werden.
Da in dominanten Genotypen sowohl Naringenin als auch Eriodictyol vorhanden ist, und die Flavanon-Oxidase beide Flavanone umsetzen kann, findet man in diesen Genotypen neben Luteolin auch noch Apigenin (inkomplette Dominanz). Die folgende Abbildung (Abb. 30) gibt eine zusammenfassende Darstellung der enzymatischen Synthese der Zwischen- und Endprodukte in Abhängigkeit dominanter Eos-Allele.

Die Interpretation der Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität im Ht dominanten und ht rezessiven Genotyp von Petunia hybrida wurde durch die 3′,5′-Hydroxylase-Aktivität erschwert, die trotz rezessiver hf-Allele vorhanden war.
In Inkubationen mit Naringenin und Extrakten aus Ht hf - Genotypen wurde zwar als Hauptprodukt ERI synthetisiert, daneben war aber auch immer eine geringe Synthese von PHF zu beobachten. In Inkubationen mit hthf-Genotypen trat entgegen den Erwartungen neben wenig PHF ebenfalls noch eine geringe Menge an ERI auf.
Das Vorkommen von ERI in ht rezessiven Genotypen warf die

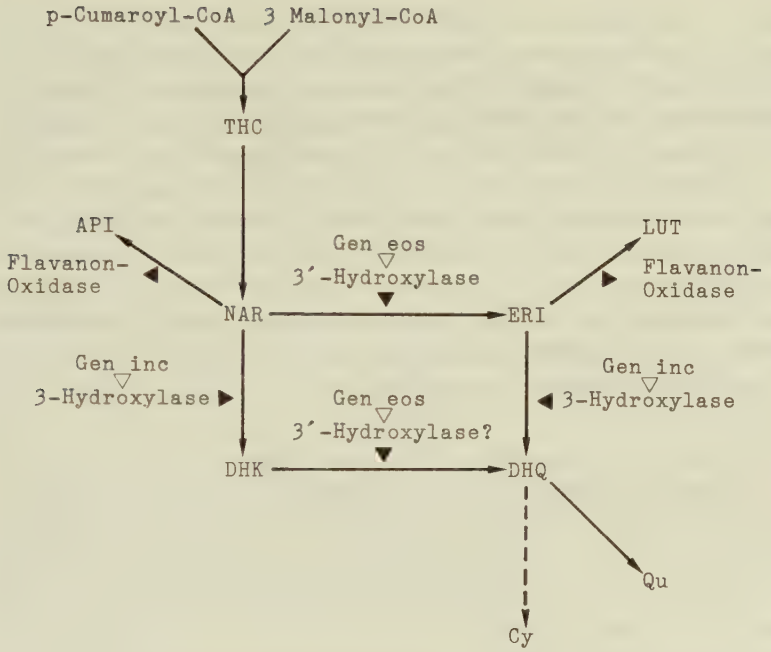



Abb. 30: Biosynthese der Zwischen- und Endprodukte in anthocyanhaltigen, dominanten Genotypen (Eos/Eos) von A. majus.

——→ : bekannte Enzymreaktionen
- - - - - → : unbekannte Enzymreaktionen
THC=Tetrahydroxychalkon.

Frage auf, ob es das Produkt der 3'-Hydroxylase-Aktivität darstellt, oder ob es als Zwischenprodukt der 3',5'-Hydroxylase-Aktivität anzusehen ist. Für diese letztere Möglichkeit sprachen Experimente, die gezeigt hatten, daß die 3',5'-Hydroxylase-Aktivität im in vitro Test nicht nur zur Synthese von PHF, sondern auch zur Synthese von ERI führt. Diese Frage konnte unter Einbeziehung der anl-Mutanten W 42 und W 24 eindeutig beantwortet werden:
In beiden Linien war in Abhängigkeit der rezessiven anl-Alle-le keine 3',5'-Hydroxylase-Aktivität nachweisbar (Tab. XXIV). Durch die selektive Unterdrückung der 3',5'-Hydroxylase-Aktivität boten somit die anl-Mutanten die Möglichkeit, die

Wirkung des Gens Ht zu erfassen.
Während in Anwesenheit dominanter Ht-Allele (W 42) ERI synthetisiert wurde, konnte in Genotypen mit rezessiven Allelen kein Umsatz des eingesetzten Naringenins beobachtet werden. Diese Ergebnisse belegen eindeutig die genetische Kontrolle der Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität durch das Gen Ht: Dominante Ht-Allele führen zu einer aktiven 3′-Hydroxylase, während in Gegenwart rezessiver Allele die Enzymaktivität total ausfällt.
Das Auftreten von ERI in ht-rezessiven, aber An1-dominanten Genotypen kann somit eindeutig auf die Aktivität der 3′,5′-Hydroxylase zurückgeführt werden.

Da die früher beschriebenen, genetisch definierten Linien von Lathyrus odoratus nicht vorlagen, kann eine genetische Kontrolle der Flavonoid-3′-Hydroxylase in dieser Gattung nicht exakt bewiesen werden. Doch deuten die enzymatischen Befunde in Verbindung mit dem Hydroxylierungsmuster der Flavonoide und der beschriebenen Genetik darauf hin, daß die in vitro beobachtete Enzymaktivität auch in vivo für die 3′-Hydroxylierung der Flavonoide verantwortlich ist.
Nach der von Beale et al. (1939) beschriebenen Genetik der Blütenfarben besitzt der rote Cyanidin-Typ dominante Allele am Locus sm, während der scharlachrote Pelargonidin-Typ durch rezessive Allele gekennzeichnet ist.
Entsprechend dieser genetischen Situation war die Aktivität der 3′-Hydroxylase nur in Extrakten aus den karminroten Sorten, die Cyanidin enthalten, vorhanden. In der lachsroten, Pelargonidin-führenden Sorte wurde die 3′-Hydroxylase-Aktivität hingegen nie beobachtet.
Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das Gen sm die Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität kontrolliert.

Der Nachweis der genetischen Kontrolle der Flavonoid-3′-Hydroxylase in Callistephus chinensis gelang bisher nicht. In dieser Pflanze entscheiden die multiplen Allele r,r′,R darüber, welches Anthocyan bevorzugt gebildet wird.
Im "Pelargonidin-Typ" (rr) war eine schwache 3′-Hydroxylase-Aktivität vorhanden, welche die in den Blüten vorliegende

Menge an Cyanidin erklären könnte.
Da r′r′-Typen überwiegend Cyanidin enthalten, sollten sie eine wesentlich erhöhte 3′-Hydroxylase-Aktivität aufweisen. Diese Erwartung konnte jedoch in vitro nicht bestätigt werden. Die 3′-Hydroxylase-Aktivität war ähnlich gering wie im Pelargonidin-Typ.
Da als Ursache hierfür unzureichende Aufarbeitungs- und Testbedingungen weitgehend ausgeschlossen werden konnten, muß in Betracht gezogen werden, ob die in r′r′-Typen verstärkt gebildeten 3′,4′-hydroxylierten Flavonoide über die Chalkonsynthase-Reaktion mit Kaffeoyl-CoA synthetisiert werden. Es gibt Hinweise darauf, daß die Chalkonsynthase aus Callistephus neben p-Cumaroyl-CoA auch Kaffeoyl-CoA umsetzt, wenn auch mit einer geringeren Effizienz (Spribille, 1982). Genaue Untersuchungen der Substratspezifität der Chalkonsynthase in Abhängigkeit der R-Allele stehen allerdings noch aus. Somit konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt werden, welche Wirkung die r′-Allele auf Enzymebene besitzen, d.h. wie das Hydroxylierungsmuster von Cyanidin im r′r′-Typ erreicht wird.

c) Zeitpunkt der Hydroxylierung

Zu der seit langem umstrittenen Frage nach dem Zeitpunkt der Substitution des B-Rings werden zwei Hypothesen diskutiert:
Nach der von Hess (1968) formulierten "Zimtsäurestarthypothese" wird das Substitutionsmuster des B-Rings bereits durch die genetisch kontrollierte Auswahl entsprechend substituierter Zimtsäuren festgelegt.
Die "Substitutionshypothese" (Grisebach, 1968) geht hingegen davon aus, daß das Substitutionsmuster erst auf $C_{15}$-Ebene durch gengesteuerte Substitutionsschritte determiniert wird. Beide Hypothesen stützen sich vor allem auf Precursor-Versuche mit radioaktiven Substanzen und auf Supplementationsexperimente mit geeigneten Vorstufen. Erst der erfolgreiche Nachweis von Flavonoid-spezifischen Hydroxylasen in Verbindung mit Untersuchungen der Substratspezifität der Chalkonsynthase ermöglichte eine sichere Entscheidung zugunsten der

einen oder anderen Hypothese.

Die Zimtsäurestarthypothese setzt eine hohe Substratspezifität der Chalkonsynthase hinsichtlich eines bestimmten Zimtsäure-CoA-Esters voraus. Für die Biosynthese von Pelargonidin bzw. Cyanidin würde das bedeuten, daß die Chalkonsynthase im Falle der Synthese von Pelargonidin nur p-Cumaroyl-CoA umsetzt, im Falle von Cyanidin hingegen nur Kaffeoyl-CoA.
Die "Substitutionshypothese" erfordert Enzyme, die spezifisch den B-Ring modifizieren. In Cyanidin-führenden Linien sollte dementsprechend ein hydroxylierendes Enzym vorhanden sein, das Flavonoide in 3′-Position hydroxyliert.
Die Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Matthiola incana war dafür ein erstes Beispiel (Forkmann et al., 1980).

Zur Diskussion über den Zeitpunkt der 3′-Hydroxylierung des B-Rings bei A. majus können Ergebnisse von chemogenetischen Analysen, Supplementationsexperimenten und enzymatischen Untersuchungen herangezogen werden.
In Pelargonidin-haltigen Genotypen (eos/eos) finden sich als Zwischenprodukte nur 4′-hydroxylierte Flavonoide (NAR, DHK), während in Cyanidin-haltigen Genotypen (Eos/Eos) zusätzlich 3′,4′-hydroxylierte Flavonoide (ERI, DHQ) vorhanden sind. Mutanten, die durch den Ausfall der Flavanon-3 -Hydroxylase-Aktivität auf Flavanon-Ebene blockiert sind, reichern in Abhängigkeit dominanter eos-Allele NAR, ERI, API und LUT an. Diese chemogenetischen Analysen deuten darauf hin, daß die 3′-OH-Gruppe auf Flavonoid- insbesondere auf Flavanon-Ebene eingeführt wird.
Supplementationsexperimente von Stickland und Harrison (1974), bei denen DHK die Synthese von Cyanidin initiieren konnte, sprechen ebenfalls für eine 3′-Hydroxylierung auf Flavonoid-Ebene, die in diesem Fall sogar noch auf Dihydroflavonol-Ebene möglich ist.
In Übereinstimmung mit den chemogenetischen Ergebnissen besteht eine strenge Korrelation zwischen der Aktivität der Flavonoid-3′-Hydroxylase und den Wildtypallelen am Locus Eos. Das Vorliegen von Flavonoiden, die nur in 4′-Position hydroxyliert sind, ist somit auf den Ausfall der 3′-Hydroxylase-

Aktivität zurückzuführen.
Während die Flavonoid-3′-Hydroxylase-Aktivität eindeutig unter der Kontrolle des Gens eos steht, ist die Substratspezifität der Chalkonsynthase völlig unabhängig von der Allelsituation am Locus eos. Sowohl im Wildtyp (Eos/Eos) als auch im rezessiven Genotyp (eos/eos) kann sie nur p-Cumaroyl-CoA als Substrat verwenden. (Spribille und Forkmann, 1982a). Diese Ergebnisse belegen, daß das Substitutionsmuster von Cyanidin nicht durch den spezifischen Einbau von Kaffeoyl-CoA ins Flavonoid-Gerüst erreicht wird, sondern durch die enzymatische 3′-Hydroxylierung von Flavonoiden. Da DHK im Gegensatz zu NAR kein eindeutiges Substrat der Flavonoid-3′-Hydroxylase darstellt, sprechen die enzymatischen Befunde für die 3′-Hydroxylierung insbesondere auf Flavanon-Ebene.
Somit wird das Hydroxylierungsmuster von Cyanidin in A. majus gemäß der Substitutionshypothese verwirklicht.

Schon aus Supplementationsexperimenten bei Petunia hybrida ging hervor, daß das Gen Htl für die Einführung der 3′-OH-Gruppe in das Flavonoid-Molekül, insbesondere auf Dihydroflavonol-Ebene verantwortlich ist (Tabak et al., 1978, Tabak et al., 1981).
Diese Auffassung wurde durch chemogenetische Untersuchungen von Mutanten, die entweder Zimtsäuren oder Flavanone oder Dihydroflavonole akkumulieren, bestätigt (Doodeman et al., 1982). Während auf Zimtsäure-Ebene unabhängig von der Allelsituation am Locus Htl p-Cumarsäure- und Kaffeesäure-Derivate akkumuliert werden, kontrolliert das Gen Htl das Hydroxylierungsmuster der angereicherten Flavanon- bzw. Dihydroflavonol-Glykoside. Den entscheidenden Beweis für die 3′-Hydroxylierung auf Flavonoid-Ebene lieferte der Nachweis der 3′-Hydroxylase, die unter der Kontrolle des Gens Htl steht und auf Flavonoid-Ebene wirksam wird. NAR scheint das bevorzugte Substrat der 3′-Hydroxylase zu sein.

Genaue Daten über die Substratspezifität der Chalkonsynthase in Abhängigkeit vom Htl-Gen liegen nicht vor. Da aber die Chalkonsynthase sowohl im dominanten als auch im rezessiven Htl-Genotyp p-Cumaroyl-CoA als Substrat verwendet (Spribille, 1982), kann eine Htl kontrollierte Substratspezifität der Chalkonsynthase weitgehend ausgeschlossen werden.
Somit trifft die Substitutionshypothese hinsichtlich der Synthese von Cyanidin auch bei Petunia hybrida zu.

Obwohl für die Chalkonsynthase aus Lathyrus odoratus keine Daten hinsichtlich der Substrateigenschaften von Kaffeoyl-CoA vorliegen, weist schon die Verwendung von p-Cumaroyl-CoA sowohl im Pelargonidin- als auch im Cyanidin-Typ darauf hin (Spribille, 1982), daß das Hydroxylierungsmuster von Cyanidin wahrscheinlich nicht über die spezifische Auswahl von Kaffeoyl-CoA erreicht wird, sondern erst auf der Ebene des $C_{15}$-Gerüsts. Diese Vermutungen stehen in völliger Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur Aktivität der Flavonoid-3′-Hydroxylase. Es besteht eine strenge Korrelation zwischen der Aktivität der 3′-Hydroxylase und der Anwesenheit von Cyanidin. Die in vitro Versuche deuten darauf hin, daß die 3′-Hydroxylierung bevorzugt auf Flavanon-Ebene abläuft.

Die Synthese von Cyanidin gemäß der Substitutionshypothese trifft somit offensichtlich nicht nur für Matthiola incana (Forkmann et al., 1980; Spribille und Forkmann, 1981), sondern auch für Antirrhinum majus, Petunia hybrida und Lathyrus odoratus zu.
Dagegen kann bei Callistephus chinensis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht entschieden werden, wann die 3′-OH-Gruppe des B-Rings determiniert wird, da die 3′-Hydroxylase-Aktivität nicht zuverlässig nachweisbar war und ferner keine genetische Kontrolle der 3′-Hydroxylase-Aktivität oder der Substratspezifität der Chalkonsynthase belegt werden konnte.

Die enzymatischen Verhältnisse bei Petersilie-Zellkulturen sprechen ebenfalls für die Substitutionshypothese.
Obwohl die Chalkonsynthase neben p-Cumaroyl-CoA auch Kaffeoyl-CoA umsetzt (Saleh et al., 1978), so deutet doch der Nachweis der 3′-Hydroxylase (Britsch et al., 1981), die ausschließlich auf Flavanon-Ebene wirksam wird, darauf hin, daß die 3′-OH-Gruppe erst auf Flavonoid-Ebene eingeführt wird.

Ein abweichendes System für die Ausbildung des Hydroxylierungsmusters von Cyanidin scheint bei Silene dioica vorzuliegen (Kamsteeg et al., 1980 und 1981).
In Silene dioica betrifft das Gen P sowohl das Hydroxylierungsmuster des B-Rings der Anthocyane als auch das Hydroxylierungsmuster des Acyl-Rests. In Blüten des dominanten Genotyps (P/P) liegen Cyanidin-Glykoside vor, die mit Kaffeoyl-CoA acyliert sind, während in Blüten des rezessiven Genotyps (p/p) Pelargonidin-Glykoside vorkommen, die mit p-Cumaroyl-CoA acyliert sind. Die Pleiotropie des Gens P ließ vermuten, daß dieses Gen die Hydroxylierung von p-Cumaroyl-CoA zu Kaffeoyl-CoA betrifft.
Enzymatische Untersuchungen an dominanten Genotypen (P/P) erbrachten den Nachweis der p-Cumaroyl-CoA-3-Hydroxylase, die in Gegenwart von NADPH und FAD die Hydroxylierung von p-Cumaroyl-CoA zu Kaffeoyl-CoA katalysiert. In rezessiven Genotypen (p/p) war diese Aktivität nicht vorhanden. Die genetische Kontrolle weist darauf hin, daß in Silene dioica das Hydroxylierungsmuster von Cyanidin auf p-Cumaroyl-CoA-Ebene determiniert wird. Die auf Kaffeoyl-CoA erweiterte Substrataffinität der Chalkonsynthase bestätigt diese Auffassung. Dieses System entspricht aber dennoch nicht der Zimtsäurestarthypothese, da hier nicht die Auswahl des entsprechend substituierten Zimtsäure-CoA-Esters genetisch kontrolliert wird. Ferner ist hier noch nicht geprüft, ob dieses Enzym nicht auch Flavonoide wie Naringenin und Dihydrokämpferol als Substrat verwenden kann.

5. Flavonoid-3′, 5′-Hydroxylase

Zu Beginn dieser Arbeit war die enzymatische Hydroxylierung des B-Rings in 5′-Position noch völlig offen.
Durch die Verwendung geeigneter Blütenfarbtypen bzw. genetisch definierter Linien war es nun möglich, die Flavonoid-3′, 5′-Hydroxylase in Blüten verschiedener Pflanzengattungen (Verbena hybrida, Lathyrus odoratus, Callistephus chinensis, Petunia hybrida) nachzuweisen.

a) Eigenschaften

Die Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase aus allen vier Pflanzengattungen erwies sich als ein mikrosomales Enzym, dessen Aktivität von NADPH und $O_2$ abhängt. NADH konnte die Kofaktorfunktion nur eingeschränkt übernehmen. Diese Eigenschaften klassifizieren die Enzymaktivität als Monooxygenase (Ullrich und Duppel, 1975).

Die Reaktion der 3′,5′-Hydroxylase aus Petunien ist durch EDTA, pCMB und DPC geringfügig hemmbar, während die Reaktion der entsprechenden Enzyme aus Verbenen und Wicken weder durch diese Inhibitoren noch durch KCN oder DDC reduziert werden kann.

Die 3′,5′-Hydroxylasen aus den verschiedenen Pflanzen besitzen alle ein pH-Optimum von pH 7.5.

Der Verlauf der Enzymreaktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zeigt bei Verbenen nur eine kurze Linearität bis maximal 10 min. Ein ähnliches Verhalten, für das möglicherweise die Temperatursensitivität des membrangebundenen Enzymsystems verantwortlich ist, zeigen auch andere membrangebundene Enzyme wie die Zimtsäure-4-Hydroxylase, die Flavanon-Oxidase und die Flavonoid-3′-Hydroxylase aus Blüten verschiedener Gattungen.

In Inkubationen mit NAR als Substrat kann die Synthese von ERI und PHF beobachtet werden. Authentisches 3′,4′,5′-hydroxyliertes Flavanon (PHF), das zu Beginn dieser Arbeit noch

nicht in der Natur gefunden worden war, konnte kürzlich erstmals in Helichrysum bracteatum nachgewiesen werden (Forkmann, 1983). Ferner wurden mittlerweile in einer Flavanon-anreichernden Mutante von Petunia hybrida Glykoside beobachtet, bei deren Aglykon es sich sehr wahrscheinlich ebenfalls um dieses Flavanon handelt (Doodeman et al., 1982).

Neben Naringenin kann auch Dihydrokämpferol als Substrat für die Hydroxylierung in 3',5'-Position dienen. Diese Reaktion, die zur Synthese von Dihydroquercetin und Dihydromyricetin führt, weist allerdings bei Lathyrus odoratus, Petunia hybrida und Callistephus chinensis eine geringere Umsatzrate auf als die Enzymreaktion mit Naringenin.
Ferner konnte gezeigt werden, daß das bereits in 3',4'-Position hydroxylierte Eriodictyol ebenfalls noch in das 3',4',5'-hydroxylierte Produkt umgewandelt werden kann. Dasselbe trifft auch für Dihydroquercetin im Falle der Enzymaktivität aus Verbenen zu.

Die Beobachtung, daß bei allen Enzymtests mit NAR bzw. DHK als Substrat nicht nur das 3',4',5'-hydroxylierte Produkt (PHF bzw. DHM) auftritt, sondern immer auch das 3',4'-hydroxylierte (ERI bzw. DHQ), wirft die Frage auf, ob das synthetisierte ERI bzw. DHQ das Zwischenprodukt der 3',5'-Hydroxylase-Reaktion darstellt, oder ob es von einer im gleichen Proteinextrakt vorhandenen 3'-Hydroxylase synthetisiert wird, d.h. ob die Synthese des 3',5'-hydroxylierten Produkts von einem oder von zwei Enzymen katalysiert wird.
Für die Diskussion dieser Frage sind folgende Befunde der in vitro Reaktion wichtig:

- Wie die 5'-Hydroxylierungsaktivität so ist auch die 3'-Hydroxylierungsaktivität mikrosomal gebunden und NADPH abhängig. Beide Aktivitäten verhalten sich synchron bezüglich der untersuchten Parameter des Enzymtests (Protein- und Zeitabhängigkeit, pH-Optimum, Inhibitoren).
- Die 3'-Hydroxylierung kann nur dann beobachtet werden, wenn auch 5'-Hydroxylierungsaktivität vorhanden ist.
- Eine separate 5'-Hydroxylierung kann mit ERI als Sub-

strat beobachtet werden.

Diese biochemischen Befunde sprechen zwar für das Vorhandensein eines einzigen Enzyms, welches schrittweise zwei Hydroxyl-Gruppen in das Flavonoid-Molekül einführt, doch schließen sie nicht aus, daß zwei Enzyme vorliegen. Diese letztere Möglichkeit ist denkbar, zumal die 3′-Hydroxylase-Aktivität aus Cyanidin-Typen von Wicken in vitro ein ähnliches Verhalten zeigt wie die 3′,5′-Hydroxylierungsaktivität aus den Delphinidin-Typen.

Entscheidende Hinweise zur Interpretation der Enzymreaktion liefern die genetischen Daten zur 3′,5′-Hydroxylierung. Sowohl bei Verbena hybrida als auch bei Lathyrus odoratus und Petunia hybrida wird der Übergang vom 4′-hydroxylierten zum 3′,4′,5′-hydroxylierten Flavonoid nur von einem Gen kontrolliert. Dies deutet darauf hin, daß die Reaktion von NAR über ERI zu PHF von einem einzigen Enzym katalysiert wird. In diesem Fall kann die Synthese von ERI als Zwischenprodukt der 3′,5′-Reaktion interpretiert werden.
Für Petunien kann außerdem eindeutig bewiesen werden, daß ERI das Zwischenprodukt der 3′,5′-Hydroxylase-Reaktion und nicht das Produkt der 3′-Hydroxylase-Aktivität darstellt, da ERI auch in Tests synthetisiert wird, in denen aufgrund rezessiver htl-Allele keine 3′-Hydroxylase-Aktivität vorhanden ist. Das Auftreten von 3′,4′-hydroxylierten Flavonoiden ist möglicherweise nur für die in vitro Reaktion charakteristisch, da die verwendeten Blüten von Petunien und Wicken nur Delphinidin-Derivate nicht aber Cyanidin-Derivate enthalten.

b) Kontrolle der Enzymaktivität

Korrelationen zwischen Gen und Enzymaktivität bzw. zwischen Hydroxylierungsmuster der flavonoiden Inhaltsstoffe und Enzymaktivität geben Aufschluß über die Bedeutung der 3′,5′-Hydroxylase-Aktivität in vivo.

In blauen Blüten von Verbena hybrida, die neben wenig Cyanidin überwiegend Delphinidin enthalten, ist die Flavonoid-3',5'-Hydroxylase-Aktivität vorhanden, während sie in den roten Blüten, die hauptsächlich Pelargonidin und wenig Cyanidin enthalten, nicht nachweisbar ist. Diese Korrelation zwischen der Aktivität der 3',5'-Hydroxylase und der Anwesenheit von Delphinidin weist darauf hin, daß die in vitro nachgewiesene Enzymaktivität auch in vivo wirksam ist. Sie steht höchstwahrscheinlich unter der Kontrolle des Gens P, das nach Beale et al. (1940) für die Ausbildung des Hydroxylierungsmusters von Delphinidin verantwortlich ist.
Das Auftreten von wenig Cyanidin sowohl im Pelargonidin-Typ als auch im Delphinidin-Typ ist folgendermaßen erklärbar: Die Synthese von Cyanidin als Nebenprodukt der 3',5'-Hydroxylase-Aktivität in vivo kann zumindest für den Pelargonidin-Typ ausgeschlossen werden, da dieser zwar Cyanidin, aber weder eine 3' - noch eine 3',5'-Hydroxylase-Aktivität enthält. Durch den Nachweis einer auf Kaffeoyl-CoA erweiterten Substrataffinität der Chalkonsynthase (Spribille, 1982) muß vielmehr angenommen werden, daß das Hydroxylierungsmuster von Cyanidin durch den Einbau von Kaffeoyl-CoA erreicht wird.

Im Gegensatz zu Verbena hybrida enthalten die Blüten von Lathyrus odoratus entweder Delphinidin oder Cyanidin oder Pelargonidin.
Entsprechend dem Hydroxylierungsmuster der Anthocyane ist die Flavonoid-3',5'-Hydroxylase nur im Delphinidin-Typ nachweisbar, nicht aber im Cyanidin- und Pelargonidin-Typ. Aufgrund von Mischexperimenten kann die Existenz eines löslichen Inhibitors im Cyanidin- und Pelargonidin-Typ ausgeschlossen werden. Die beobachtete 3',5'-Hydroxylase-Aktivität ist offensichtlich für die Synthese der 3',4',5'-hydroxylierten Flavonoide einschließlich Delphinidin verantwortlich. Frühere chemogenetische Untersuchungen (Beale et al., 1939) haben ergeben, daß das Gen E die Synthese der 3',4',5'-hydroxylierten Flavonoide betrifft. Somit deuten die enzymatischen Ergebnisse in Verbindung mit den chemogenetischen Befunden

auf eine Korrelation zwischen dem Gen E und der 3',5'-Hydroxylase-Aktivität hin.

Im Gegensatz zu Lathyrus odoratus und Petunia hybrida wird bei Callistephus chinensis die 3'- und die 3',5'- Hydroxylierung nicht von 2 Genen, sondern von einem Gen (Gen R) mit 3 Allelen kontrolliert. Da in den Blüten jedoch Mischungen verschieden hydroxylierter Anthocyane vorliegen, scheinen die R-Allele lediglich zu bestimmen, welches Anthocyanidin hauptsächlich gebildet wird. So führen die Allele RR vor allem zu Delphinidin, die r'r'-Allele verschieben das Mischungsverhältnis zugunsten von Cyanidin, und in Gegenwart der rr-Allele liegt hauptsächlich Pelargonidin vor. Enzymatische Untersuchungen dieser 3 Genotypen ergaben, daß die 3',5'-Hydroxylase-Aktivität gemessen an synthetisiertem Pentahydroxyflavanon ausschließlich im RR-Typ vorhanden ist. Dies zeigt, daß die Allele RR für eine aktive 3',5'-Hydroxylase kodieren, während die rezessive Mutation rr zu einem Ausfall der 3',5'-Hydroxylase-Aktivität führt.
Dagegen verbleibt der Einfluß der r'-Allele auf die Hydroxylierungsreaktionen noch völlig offen. Obwohl die Blüten des r'-Genotyps viel Cyanidin und etwas Delphinidin und Pelargonidin enthalten, konnte weder eine ausreichend hohe 3'-Hydroxylase-Aktivität noch eine 3',5'-Hydroxylase Aktivität nachgewiesen werden. Das Fehlen der letzteren Aktivität könnte allerdings ein Problem der Nachweisgrenze in vitro sein.

Das Gen An1 bei Petunia hybrida betrifft die Umwandlung der Dihydroflavonole zu den Anthocyanen. So werden in Blüten rezessiver an1-Mutanten keine Anthocyane synthetisiert, stattdessen findet man eine Akkumulation von Dihydroflavonolen (Kho et al., 1977).
Enzymatische Untersuchungen an diesen Mutanten wiesen auf eine genetische Kontrolle der Anthocyanidin-3-O-Glucosyltransferase- und Methyltransferase-Aktivität durch das Gen

Anl hin (Kho et al., 1978; Schram, persönliche Mitteilung). Ferner ergaben chemogenetische Untersuchungen zum Hydroxylierungsmuster der angereicherten Dihydroflavonole, daß unabhängig von der Allelsituation am Locus Hfl nur Dihydrokämpferol angereichert wird (Tabak et al., 1981; Gerats et al., 1982). Die vorliegenden enzymatischen Ergebnisse zur Aktivität der Flavonoid-3',5'-Hydroxylase bestätigen diesen Befund. Während in Genotypen mit dominanten Anl-Allelen immer 3',5'-Hydroxylase-Aktivität vorhanden war, fehlte diese Enzymaktivität in den rezessiven Genotypen völlig.
Somit kontrolliert das Gen Anl offensichtlich nicht nur die Aktivität der Glucosyltransferase und Methyltransferase, sondern auch die Aktivität der Flavonoid-3',5'-Hydroxylase. Dies unterstützt die Vermutung, daß es sich bei Anl um ein Regulatorgen handelt.
Im Gegensatz dazu ist möglicherweise das Gen Hfl, das für die Synthese von 3',4',5'-hydroxylierten Flavonoiden verantwortlich ist, ein Strukturgen, welches für die Flavonoid-3',5'-Hydroxylase kodiert. Wie allerdings die 3',5'-Hydroxylase-Aktivität durch das Gen Hfl kontrolliert wird, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht entschieden werden, da diese Enzymaktivität nicht nur im dominanten, sondern in geringerem Maß auch im rezessiven Genotyp vorhanden war. Die bisherigen Versuche lassen vermuten, daß sich dominante bzw. rezessive Hfl-Allele nicht im Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein der 3',5'-Hydroxylase-Aktivität manifestieren, sondern vielmehr das Maß der Enzymaktivität beeinflussen. Diese Vermutung wird durch die chemogenetischen Ergebnisse unterstützt, die zeigen, daß nicht nur in Hf-dominanten Genotypen Delphinidin und andere 3',4',5'-hydroxylierte Flavonoide vorliegen, sondern auch in hf-rezessiven Genotypen; dort allerdings nur in geringen Mengen (Wiering, 1974).
Unter Einbeziehung der Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Blütenstadium sind 2 Möglichkeiten denkbar:

1. Der Unterschied zwischen rezessiven und dominanten Allelen liegt in zeitlich versetzten Aktivitätsmaxima während der Blütenentwicklung.

2. In Gegenwart rezessiver Allele liegt eine geringe Enzymaktivität vor, die sich im Verlauf der Blütenentwicklung nicht ändert. Im Gegensatz dazu ist die Enzymaktivität unter dem Einfluß dominanter Allele zu einem bestimmten Zeitpunkt der Blütenentwicklung stark erhöht.

Erste Versuche zu diesem Problem sprechen für die Realisierung der zweiten Möglichkeit.
Zur endgültigen Klärung des Problems sollten - unter der Voraussetzung exakt vergleichbarer Blütenstadien und Proteinmengen - weitere Versuche zur Blütenstadienabhängigkeit der 3′,5′-Hydroxylase-Aktivität in Mikrosomenfraktionen dominanter und rezessiver Genotypen durchgeführt werden.

c) Zeitpunkt der 3′,5′-Hydroxylierung

Im Falle der Biosynthese von Delphinidin muß nach der "Zimtsäurestarthypothese" eine 3,4,5 -Trihydroxyzimtsäure postuliert werden, die bisher jedoch noch nicht in der Natur gefunden worden ist.
Fütterungsversuche mit der chemisch synthetisierten, radioaktiv markierten Trihydroxyzimtsäure bei Campanula medium ergaben, daß diese besser in Delphinidin eingebaut wird als Kaffeesäure und p-Cumarsäure. Dies wurde als Hinweis dafür gewertet, daß das Substitutionsmuster von Delphinidin bereits auf der Stufe der Zimtsäuren festgelegt wird (Meier und Zenk, 1965).

Gemäß der "Zimtsäurestarthypothese" sollte das Gen, welches für die Einführung der Hydroxylgruppen in 3′und 5′-Position verantwortlich ist, die Substratspezifität der Chalkonsynthase in der Weise kontrollieren, daß im Delphinidin-Typ ausschließlich der Trihydroxyzimtsäure-CoA-Ester als Substrat verwendet wird. Die Hypothese konnte bisher allerdings noch nicht auf dieser Ebene überprüft werden, da der erforderliche Trihydroxyzimtsäure-CoA-Ester nicht verfügbar ist.

Die "Substitutionshypothese" postuliert positionsspezifisch modifizierende Enzyme. Im Falle der Synthese von Delphinidin

sollten Enzyme nachweisbar sein, die den B-Ring der Flavonoide spezifisch in 3',5'-Position hydroxylieren.

Flavonoid-3',5'-Hydroxylase-Aktivität ist in den Delphinidin-führenden Blüten von Verbena hybrida, Lathyrus odoratus, Callistephus chinensis und Petunia hybrida vorhanden. Wenn auch die genetische Kontrolle dieser Enzymaktivitäten noch nicht exakt bewiesen werden konnte, so deuten doch die Korrelationen zwischen dem Hydroxylierungsmuster der Flavonoide und dem Auftreten der 3',5'-Hydroxylase-Aktivität darauf hin, daß diese Enzymaktivität auch in vivo von Bedeutung ist. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis setzt die Chalkonsynthase aus den jeweiligen Delphinidin-Typen p-Cumaroyl-CoA als Substrat um (Spribille, 1982).
Bei Petunien liegen ferner chemogenetische Daten vor, die ebenfalls für eine 3',5'-Hydroxylierung auf $C_{15}$-Ebene sprechen (Doodeman et al., 1982). Mutanten, die auf Flavanon- bzw. Dihydroflavonolebene blockiert sind, akkumulieren in Abhängigkeit dominanter Hf1-Allele 3',4',5'-hydroxylierte Flavonoide. Mutanten hingegen, die Zimtsäuren anreichern, enthalten unabhängig von der Allelsituation am Locus Hf1 nur p-Cumarsäure und Kaffeesäure.
Für eine 3',5'-Hydroxylierung insbesondere auf Dihydroflavonolebene sprechen außerdem Supplementationsexperimente an an3-blockierten Genotypen, bei denen DHK die Synthese von 3',4',5'-hydroxylierten Anthocyanidinen initiierte (Tabak et al., 1981).
In vitro kann die 3',5'-Hydroxylierung sowohl mit NAR als auch mit DHK beobachtet werden, jedoch scheint hier das Flavanon bevorzugt hydroxyliert zu werden.

Somit weisen alle experimentellen Befunde darauf hin, daß das Substitutionsmuster von Delphinidin in Verbena hybrida, Lathyrus odoratus, Callistephus chinensis und Petunia hybrida gemäß der Substitutionshypothese erst auf der Ebene der Flavonoide determiniert wird.

Die an verschiedenen Pflanzengattungen gewonnenen Ergebnisse zur Frage nach dem Zeitpunkt der Hydroxylierung des B-Rings der Flavonoide sprechen alle für eine gemäß der "Substitutionshypothese" verwirklichte Hydroxylierung auf Flavonoid-Ebene.
Das einzig bekannte Beispiel für eine frühere Hydroxylierung ist bei Silene dioica beschrieben (Kamsteeg et al., 1980, 1981). Hier wird die 3'-OH-Gruppe bereits auf p-Cumaroyl-CoA-Ebene eingeführt.
Die Untersuchungen der Chalkonsynthase aus Tulpen-Antheren (Sütfeld et al., 1978) deuten auf eine weitere Möglichkeit zur Modifizierung des B-Rings hin. Entsprechend dem Hydroxylierungsmuster der angereicherten Chalkonglykoside, verwendet die Chalkonsynthase nicht nur p-Cumaroyl-CoA, sondern auch Kaffeoyl-CoA und Feruoyl-CoA zur Synthese des Flavonoid-Grundgerüsts. Diese Eigenschaft der Chalkonsynthase steht allerdings nicht mit der "Zimtsäurestarthypothese" in Einklang, welche die genetisch kontrollierte Auswahl einer spezifischen Zimtsäure fordert.
Diese Befunde sprechen dafür, daß mindestens 3 verschiedene Möglichkeiten der Hydroxylierung des B-Rings der Flavonoide in Pflanzen realisiert sind. Aufgrund der bisher vorliegenden Daten scheint davon die Hydroxylierung auf Flavonoid-Ebene am weitesten verbreitet zu sein.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Oxygenase-Reaktionen spielen in der Flavonoid-Biosynthese eine wichtige Rolle. Sie betreffen die Dihydroflavonol-Bildung, die Flavon-Synthese und die Synthese von 3',4'- bzw. 3',4',5'-hydroxylierten Flavonoiden.
Die diese Reaktionen katalysierenden Enzyme wurden in Blüten überwiegend genetisch definierter Pflanzen nachgewiesen und charakterisiert.

1. Die lösliche Flavanon-3-Hydroxylase katalysiert in Gegenwart von 2-Oxoglutarat, $Fe^{2+}$ und Ascorbat die Umwandlung der Flavanone in die Dihydroflavonole. Aufgrund der Kofaktorabhängigkeit kann sie zur Gruppe der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen gerechnet werden. Bei Antirrhinum majus und Petunia hybrida war es möglich, eine Korrelation zwischen rezessiver Mutation (inc bzw. an3) und Ausfall der 3-Hydroxylase-Aktivität aufzuzeigen. Ferner konnte auch bei weißen Blüten von Streptocarpus, Verbenen, Zinnien und Dahlien der Block in der Anthocyansynthese auf den Ausfall dieser Enzymaktivität zurückgeführt werden.

2. Die Flavanon-Oxidase aus Blüten verschiedener Pflanzengattungen ist membrangebunden und von $O_2$ und NADPH abhängig. Sie katalysiert die Oxidation von Naringenin zu Apigenin und von Eriodictyol zu Luteolin.
Sie ist nur in flavonführenden Pflanzen nachweisbar. Ein von 2-Oxoglutarat-abhängiges Dioxygenase-System, welches die Synthese der Flavone in Zellkulturen von Petersilie katalysiert, konnte in Blüten nicht nachgewiesen werden.

3. Für die Einführung der 3'-OH-Gruppe in den Ring B der Flavonoide ist die membrangebundene, $O_2$- und NADPH-abhängige Flavonoid-3'-Hydroxylase verantwortlich. Ihr bevorzugtes Substrat ist Naringenin.
Die Aktivität steht unter der Kontrolle der für die 3'-Hydroxylierung verantwortlichen Gene Eos (Antirrhinum majus) bzw. Htl (Petunia hybrida).

4. Die membrangebundene Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase katalysiert die Hydroxylierung von Naringenin und Dihydrokämpferol in 3′- und 5′-Position. Die Enzymreaktion benötigt $O_2$ und NADPH. Als Zwischenprodukt der enzymatischen 3′,5′-Hydroxylierung wird in vitro das entsprechende 3′-hydroxylierte Flavonoid synthetisiert.
   Es besteht eine strikte Korrelation zwischen der Aktivität der Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase und der Anwesenheit von 3′,4′,5′-hydroxylierten Flavonoiden in den Blüten.

Die enzymatischen Untersuchungen der Flavonoid-3′- und 3′,5′- Hydroxylasen in Verbindung mit chemogenetischen Ergebnissen konnten zeigen, daß das Hydroxylierungsmuster des B-Rings in den untersuchten Pflanzen erst auf Flavonoid-Ebene determiniert wird.

## VI. LITERATURVERZEICHNIS

ABBOTT, M.T. and UDENFRIEND, S., 1974: Molecular mechanisms of oxygen activation (O. Hayaishi, ed), p. 167-214 Academic Press, New York.

BAKER, W., 1933: Molecular rearrangement of some O-acyloxy-acetophenones and the mechanism of the production of 3-acylchromones.
J.Chem.Soc.: 1381-1389

BARTON, G.M., 1968: Detection of 3-hydroxyflavanones on papergrams and thin-layer plates.
J. Chromatogr. 34c: 562.

BEALE, G.H., 1940: The genetics of Verbena. I
J. Genetics 40: 337-358

BEALE, G.H., PRICE, J.R. and SCOTT-MONCRIEFF, R., 1940: The genetics of Verbena. II. Chemistry of the flower colour variation.
J. Genetics 41: 65-74

BEALE, G.H., ROBINSON, G.M., ROBINSON, R. and SCOTT-MONCRIEFF, R., 1939: Genetics and chemistry of flower colour variation in Lathyrus odoratus.
J. Genetics 37: 375-388

BENVENISTE, I., SALAUN, J.P. and DURST, F., 1977: Wounding-induced cinnamic acid hydroxylase in Jerusalem artichoke tuber.
Phytochem. 16: 69-73

BRADFORD, M.M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72: 248-254

BRITSCH, L., 1981: Biosynthese von Flavonen, Dihydroflavonolen und Flavonolen aus Flavanonen mit Enzympräparationen aus Petersilie-Zellsuspensionskulturen.
Diplomarbeit, 1981

BRITSCH, L., HELLER, W. and GRISEBACH, H., 1981: Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley.
Z. Naturforsch. 36c: 742-750

CHADENSON, M., HAUTEVILLE, M. and CHOPIN, J., 1972: Synthesis of 2,5-dihydroxy-7-methoxy-flavanone, cyclic structure of the benzoyl-(2,6-dihydroxy-4-methoxybenzoyl)-methane from Populus nigra buds.
J. Chem. Soc. Chem. Commun.: 107-108

DANGELMAYR, B., 1982: Nachweis von Enzymen der Flavonoid-biosynthese und der genetischen Kontrolle von Chalkon-Isomerase-Aktivität in Blüten.
Dissertation, Tübingen

DANGELMAYR, B., STOTZ, G., SPRIBILLE, R. and FORKMANN, G., 1983: Relationship between flower development, anthocyanin accumulation and activity of enzymes involved in flavonoid biosynthesis in Matthiola incana R.Br..
Z. Naturforsch., im Druck

DIESPERGER, H., MÜLLER, C.R. and SANDERMANN, H., 1974: Rapid isolation of a plant microsomal fraction by $Mg^{2+}$ precipitation.
FEBS Lett. 43: 155-158

DOODEMAN, M., TABAK, A.J.H., SCHRAM, A.W. and BENNINK, G.J.H., 1982: Hydroxylation of cinnamic acids and flavonoids during biosynthesis of anthocyanins in Petunia hybrida Hort..
Planta 154: 546-549

EBEL, J., HAHLBROCK, K. and GRISEBACH, H., 1972: Purification and properties of an o-dihydricphenol meta-O-methyltransferase from cell suspension cultures of parsley and its relation to flavonoid biosynthesis.
Biochem. Biophys. Acta 268: 313-326.

EIGEN, E., BLITZ, M. and GUNSBERG, E., 1957: The detection of some naturally occuring flavanone compounds on paper chromatograms.
Arch. Biochem. Biophys. 68: 501

FORKMANN, G., 1977: Anthocyanin pigments in Callistephus chinensis.
Phytochem. 16: 299-301

FORKMANN, G., 1980: The B-ring hydroxylation pattern of intermediates of anthocyanin synthesis in pelargonidin- and cyanidin-producing lines of Matthiola incana.
Planta 148: 157-161

FORKMANN, G., 1983: 5,7,3',4',5'-Pentahydroxyflavanone in the bracts of Helichrysum bracteatum.
Z. Naturforsch., im Druck

FORKMANN, G. and DANGELMAYR, B., 1980: Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in flowers of Dianthus caryophyllus.
Biochem. Genet. 18: 519-527

FORKMANN, G., HELLER, W. and GRISEBACH, H., 1980: Anthocyanin biosynthesis in flowers of Matthiola incana, flavanone 3- and flavonoid 3'-hydroxylases
Z. Naturforsch. 35c, 691-695.

FORKMANN, G. and KUHN, B., 1979: Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in anthers of Petunia hybrida.
Planta 144: 189-192

FRITSCH, H. and GRISEBACH, H., 1975: Biosynthesis of cyanidin in cell cultures of Haplopappus gracilis.
Phytochem. 14: 2437-2442

GEISSMAN, T.A. and HARBORNE, J.B., 1955: The chemistry of flower pigmentation in Antirrhinum majus. IV. The albino (--mm--nn) form.
Arch. Biochem. Biophys. 55/2: 447-453

GEISSMAN, T.A., JORGENSEN, E.C. and JOHNSON, B.L., 1954: The chemistry of flower pigmentation in Antirrhinum majus. Color genotypes. I. The flavonoid components of the homozygous P,M,Y color types.
Arch. Biochem. Biophys. 49: 368-388.

GERATS, A.G.M., de Vlaming, P., DOODEMAN, M., AL, B. and SCHRAM, A.W., 1982: Genetic control of the conversion of dihydroflavonols into flavonols and anthocyanins in flowers of Petunia hybrida.
Planta 155: 364-368

GRISEBACH, H., 1968: Recent investigations on the biosynthesis of flavonoids. In: Recent advances in phytochemistry Vol. 1, Ed. T.J. Mabry, R.E. Alston and V.C. Runeckles.
Appleton-Century-Crofts, New York, p. 379-406

GRISEBACH, H. und Bilhuber, W., 1967: Zur Biosynthese des Apigenins und Chrysoeriols in der Petersilie.
Z. Naturforsch. 22b: 746-751

GRISEBACH, H. and HAHLBROCK, K., 1974: Enzymology and regulation of flavonoid and lignin biosynthesis in plants and plant cell suspension cultures.
Rec. Adv. Phytochem. 8: 21-52

HAHLBROCK, K., EBEL, J., ORTMANN, R., SUTTER, A., WELLMANN, E. and GRISEBACH, H., 1971: Regulation of enzyme activities related to the biosynthesis of flavone glycosides in cell suspension cultures of parsley (Petroselinum hortense).
Biochim. Biophys. Acta 244: 7-15

HAHLBROCK, K. and GRISEBACH, H., 1970: Formation of coenzyme A esters of cinnamic acids with an enzyme preparation from cell suspension cultures of parsley.
FEBS Lett. 11 : 62-64.

HARBORNE, J.B., 1967: Inheritance and biosynthesis of flavonoids in plants. In: Comparative biochemistry of the flavonoids, p. 250-279
Academic Press, New York

HARRISON, B.J. and STICKLAND, R.G., 1974: Precursors and genetic control of pigmentation. 2. Genotype analysis of pigment controlling genes in acyanic phenotypes in Antirrhinum majus.
Heredity 33: 112-115

HAYAISHI, O., 1974: Molecular mechanisms of oxygen activation, p. 7-10, Academic Press, New York, London

HELLER, W. and HAHLBROCK, K., 1980: Highly purified flavanone synthase from parsley catalyses the formation of naringenin-chalcone.
Arch. Biochem. Biophys. 200: 617-619

HESS, D., 1968: Biochemische Genetik
Springer, Berlin-Heidelberg

KAMSTEEG, J., van BREDERODE, J. and van NIGTEVECHT, G., 1980: Genetical and biochemical evidence that the hydroxylation pattern of the anthocyanin B-ring in Silene dioica is determined at the p-coumaroyl-coenzyme A stage.
Phytochem. 19: 1459-1462

KAMSTEEG, J., van BREDERODE, J., VERSCHUREN, P.M. and NIGTEVECHT, G., 1981: Identification, properties and genetic control of p-coumaroyl-coenzyme A, 3-hydroxylase isolated from petals of Silene dioica.
Z. Pflanzenphys. 102: 435-442

KAPPERT, H., 1949: Die Genetik des incana-Charakters und der Anthocyanbildung bei der Levkoje.
Züchter 19: 289-297

KHO, K.F.F., BENNINK, G.J.H. and WIERING, H., 1975: Anthocyanin synthesis in a white flowering mutant of Petunia hybrida by a complementation technique.
Planta 127: 271-279

KHO, K.F.F., BOLSMAN-LOUWEN, A.C., VUIK, J.C. and BENNINK, G.J.H., 1977: Anthocyanin synthesis in a white flowering mutant of Petunia hybrida, II.
Planta 135: 109-118

KHO, K.F.F., KAMSTEEG, J. and van BREDERODE, J., 1978: Identification, properties and genetic control of UDP-glucose:cyanidin 3-O-glucosyltransferase in Petunia hybrida.
Z. Pflanzenphys. 88: 449-464

KOUKOL, J. and CONN, E.E., 1961: The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare.
J. Biol. Chem. 236: 2692-2698

KREUZALER, F. and Hahlbrock, K., 1972: Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: Formation of naringenin (5,7,4′-trihydroxyflavanone) from p-coumaroyl-coenzyme A and malonyl-coenzyme A.
FEBS Lett. 28: 69-72

KREUZALER, F. and HAHLBROCK, K., 1975: Enzymatic synthesis of an aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavanone synthase from cell suspension cultures of Petroselinum hortense.
Eur. J. Biochem. 56: 205-213

KUHN, B., FORKMANN, G. and SEYFFERT, W., 1978: Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in Callistephus chinensis.
Planta 138: 199-203

KUNAU, W.H., 1976: Chemie und Biochemie ungesättigter Fettsäuren.
Angewandte Chemie 88: 97-130

LAMER, E., MALCHER, E. and GRIMSHAW, J., 1968: Identification of 3′,4′,5′,5,7 -pentahydroxyflavone and its 3′-monoglucoside.
Tetrahedron Letters 10-19: 1419-1421

MEIER, H. and ZENK, M.H., 1965: Einbau von 3,4,5-Trihydroxyzimtsäure in Delphinidin.
Z. Pflanzenphys. 53: 415-421

MOUSTAFA, E. and WONG, E., 1967: Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed. Phytochem. 6: 625-632

NAIR, P.M. and VINING, L.C., 1965: Cinnamic acid hydroxylase in spinach. Phytochem. 4: 161-168

NOE, W., 1982: Regulation der Phenylalanin-Ammonium-Lyase bei Anthocyan-haltigen Zellsuspensionskulturen von Daucus carota. Dissertation, Tübingen

ORRENIUS, S. and ERNSTER, L., 1974: Molecular mechanisms of oxygen activation (O.Hayaishi, ed), p. 215-244 Academic Press, New York

POTTS, J.R.M., WEKLYCH, R. and CONN, E.E., 1974: The 4-hydroxylation of cinnamic acid by Sorghum microsomes and the requirement for cytochrome P-450. J. Biol.Chem. 249: 5019-5026

REDGWELL, R.J., TURNER, N.A. and BIELESKI, R.L., 1974: Stripping thin layers from chromatographic plates for radiotracer measurements. J. Chromatogr. 88: 25-31

RITTER-THOMAS, U., 1973: Beitrag zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Matthiola incana. Planta 114: 259-268

ROBERTS, R.J. and VAUGHAN, P.F.T., 1971: Hydroxylation of kaempferol, dihydrokaempferol and naringenin by a phenolase preparation from spinach beet. Phytochem. 10: 2649-2652

RUSSELL, D.W., 1971: The metabolism of aromatic compounds in higher plants. X. Properties of the cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolic and developmental control. J. Biol. Chem. 246: 3870-3878

RUSSELL, D.W. and CONN, E.E., 1967: The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. Arch. Biochem. Biophys. 122: 256-258

SALEH, N.A.M., FRITSCH, H., KREUZALER, F. and GRISEBACH, H., 1978: Flavanone synthase from cell suspension cultures of Haplopappus gracilis and comparison with the synthase from parsley. Phytochem. 17: 183-186

SEYFFERT, W., 1960: Über die Wirkung von Blütenfarbgenen bei der Levkoje, Matthiola incana R. Br. Z. Pflanzenzücht. 44: 4-29

SEYFFERT, W., 1971: Simulation of quantitative characters by genes with biochemically definable action. II. The material. TAG 41: 285-291

SEYFFERT, W., 1982: Beiträge zur Genetik und Enzymologie der Flavonoide.
Biol. Zbl. 101: 465-483

SHERRATT, H.S.A., 1958: The relationship between anthocyanidins and flavonols in different genotypes of Antirrhinum majus.
J. Genet. 56/1: 1-9

SPRIBILLE, R., 1982: Nachweis und Charakterisierung der Chalkonsynthase unter Verwendung definierter Genotypen höherer Pflanzen.
Dissertation, Tübingen

SPRIBILLE, R. and FORKMANN, G., 1981: Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of Matthiola incana R.Br.
Z. Naturforsch. 36c: 619-624

SPRIBILLE, R. and FORKMANN, G., 1982a: Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of Antirrhinum majus.
Phytochem. 21: 2231-2234

SPRIBILLE, R. and FORKMANN, G., 1982b: Chalcone synthesis and hydroxylation of flavonoids in 3'-position with enzyme preparations from flowers of Dianthus caryophyllus.
Planta 155: 176-182

STICKLAND, R.G. and HARRISON, B.J., 1974: Precursors and genetic control of pigmentation. 1. Induced biosynthesis of pelargonidin, cyanidin and delphinidin in Antirrhinum majus.
Heredity 33: 108-112

STÖCKIGT, J., and ZENK, M.H., 1975: Chemical synthesis and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives.
Z. Naturforsch. 30c: 352-358

SÜTFELD, R., KEHREL, B. and WIERMANN, R., 1978: Characterization, development and localization of "flavanone synthase" in tulip anthers.
Z. Naturforsch. 33c: 841-846

SÜTFELD, R. and WIERMANN, R., 1981: Purification of chalcone synthase from tulip anthers and comparison with the synthase from Cosmos petals.
Z. Naturforsch. 36c: 30-34

SUTTER, A., POULTON, J. and GRISEBACH, H., 1975: Oxidation of flavanone to flavone with cell-free extracts from young parsley leaves.
Arch. Biochem. Biophys. 170: 547-556

TABAK, A.J.H., MEYER, H. and BENNINK, G.J.H., 1978: Modification of the B-ring during flavonoid synthesis in Petunia hybrida: Introduction of the 3'-hydroxyl group regulated by the gene Htl.
Planta 139: 67-71

TABAK, A.J.H., SCHRAM, A.W. and BENNINK, G.J.H., 1981: Modification of the B-ring during flavonoid synthesis in Petunia hybrida: Effect of the hydroxylation gene Hf1 on dihydroflavonol intermediates. Planta 153: 462-465

TRAUB, A. und GEIGER, H., 1975: Nachweis von 2,5,7,3′,4′-Pentahydroxy-flavanon-5-glucosid in den Samen von Galega officinalis L. (Fabaceae). Z. Naturforsch. 30c: 823-824

ULLRICH, V. and DUPPEL, W., 1975: The enzymes (P. Boyer, ed), 3 rd ed. Vol. XII: 253-297 Academic Press, New York

VAUGHAN, P.F.T., BUTT, V.S., GRISEBACH, H. and SCHILL, L., 1969: Hydroxylation of flavonoids by a phenolase preparation from leaves of spinach beet. Phytochem. 8: 1373-1378

WIERING, H., 1974: Genetics of flower colour in Petunia hybrida Hort. Genen Phaenen 17: (1-2): 117-134

WIERING, H., de VLAMING, P., CORNU, A. and MAIZONNIER, D., 1979: Petunia genetics. I.-List of genes Ann. Amélior. Plantes 29 (5): 611-622

WILLIAMS, A.H., 1967: A dibenzoylmethane glucoside from Malus leaf. Chem. Ind. (London): 1526-1527

WIT, F., 1937: Contributions to the genetics of the china aster. Genetica 19: 1-104

Herrn Prof. Dr. W. Seyffert möchte ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Forkmann für hilfreiche Diskussionen und für sein reges Interesse am Gelingen dieser Arbeit.

Ich danke außerdem Herrn Dr. W. Heller (Universität Freiburg), von dem ich wertvolle Hinweise und eine Chalkonsynthase-Präparation aus Zellsuspensionskulturen von Petersilie erhielt, die mir eine große Hilfe waren.

Bei Frau Dr. P. de Vlaming und Herrn Dr. A. W. Schram (Universität Amsterdam) möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und für die Überlassung genetisch definierter Linien von Petunia hybrida herzlich bedanken.

Dank sagen möchte ich schließlich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die sehr menschliche und freundliche Atmosphäre.

Lebenslauf

| | |
|---|---|
| 25.09.54 | geboren in Tübingen als Tochter des Grund- und Hauptschullehrers Helmut Stotz und seiner Ehefrau Elsa, geb. Rock |
| 1961 - 1965 | Grundschule in Tübingen |
| 1965 - 1973 | Wildermuth-Gymnasium in Tübingen |
| 1973 | Abitur |
| 1974 - 1976 | Biologie-Studium an der Universität Tübingen |
| 1976 | Vordiplom-Prüfung |
| 1976 - 1979 | Biologie-Studium an der Universität Heidelberg |
| 1978 | Diplom-Prüfung |
| 1978 - 1979 | Diplomarbeit über das Thema "Methodische Untersuchungen zur Aufarbeitung und Affinitätschromatographie Cytokinin-affiner Proteine von Funaria hygrometrica" unter der Anleitung von Prof. Dr. M. Bopp |
| 1980 - 1983 | Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Genetik, an der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr.W. Seyffert über das Thema "Enzymologie und Genetik der Oxidationsreaktionen in der Flavonoid-Biosynthese höherer Pflanzen". |
| 1981 - 1983 | Wiss. Angestellte (DFG) am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Genetik |

Meine akademischen Lehrer waren:
Ammermann, Bautz, Beiderbeck, Bopp, Bunke, Bujard, Grell, Hadeler, Hoffmann-Berling, Keller, Klein, Matzura, Oberwinkler, Rähle, Rundel, Sauer, Schaller, Schwemmle, Suhr, Vogel, Willer, Zwilling.

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)